

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-127634

(P2007-127634A)

(43) 公開日 平成19年5月24日(2007.5.24)

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 T

GO 1 N 27/447 (2006.01)

GO 1 N 27/26 3 2 5 Z

審査請求 有 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2006-292153 (P2006-292153)
 (22) 出願日 平成18年10月27日 (2006.10.27)
 (31) 優先権主張番号 60/732, 994
 (32) 優先日 平成17年11月3日 (2005.11.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/795, 452
 (32) 優先日 平成18年4月27日 (2006.4.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 390019585
 ミリポア・コーポレーション
 MILLIPORE CORPORATION
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
 821、ビレリカ、コンコード・ロード・
 290
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的検定のための製品およびプロセス

(57) 【要約】

【課題】プロットティング膜上の1つまたは複数の生物学的存在を検出するための迅速、効率的で好都合な方法が提供する。

【解決手段】膜上の生物学的物質の位置、性質またはその量に関し得る。本発明の方法は、試薬を供給し除去するための圧力支援レジメントを含み、ならびに極めてわずかな量の液体を使用して、検出する膜中に埋もれた物質から汚染物質の洗浄を可能にする。プロットティング品質を損なうことなく、遮断、洗浄および抗体結合のステップを約30分で終了させることが可能になる。デバイスは、プロットティング膜の下にある多孔性支持体と、プロットティング膜の上にある分流器と、所望の領域で液体を収容し、その液体の始動容積をより低くすることを可能にする、分流器上のウェルとを含む、いくつかの層からなる。好ましくは、分流器が、0.22ミクロン膜など、非結合または低結合で親水性の多孔性膜である。

【選択図】 図1

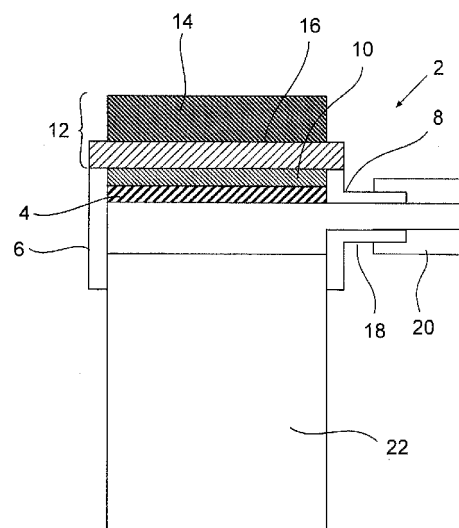


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫学的検定を実施するためのデバイスであって、
多孔性支持体と、多孔性支持体の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に取り付けられる 1 つまたは複数の試薬ウェルとを含む、デバイス。

【請求項 2】

真空支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスであって、
真空マニホールドと、多孔性支持体と、多孔性支持体の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に取り付けられる 1 つまたは複数の試薬ウェルとを含む、デバイス。

【請求項 3】

真空支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスであって、
多孔性支持体と、検定する 1 つまたは複数の生物学的存在を含み、多孔性支持体の上部上に取り付けられる 1 つまたは複数の膜と、1 つまたは複数の膜の上部上の分流器と、分流器の上部上に取り付けられる 1 つまたは複数の試薬ウェルとを含む、デバイス。

【請求項 4】

圧力支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスであって、
回収マニホールドと、多孔性支持体と、検定する 1 つまたは複数の生物学的存在を含み、多孔性支持体の上部上に位置付けられる 1 つまたは複数の膜と、1 つまたは複数の膜の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に取り付けられる 1 つまたは複数の試薬ウェルと、1 つまたは複数の試薬ウェルの上部上に取り外し可能に密封され、正圧ガス源に接続されるその内部への入口を含む加圧キャップとを含む、デバイス。

【請求項 5】

分流器および 1 つまたは複数の試薬ウェルが、一体ユニットである、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6】

分流器が、膜であり、
分流器および 1 つまたは複数の試薬ウェルが、一体ユニットである、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 7】

真空支援の免疫学的検定を実施するためのプロセスであって、
a. 真空マニホールドと、真空マニホールド上に配置される多孔性支持体と、検定する 1 つまたは複数の生物学的存在を含み、多孔性支持体上に配置される 1 つまたは複数の膜と、1 つまたは複数の膜の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に配置される 1 つまたは複数のウェルとを設けるステップと、
b. 1 つまたは複数のウェルに 1 つまたは複数の試薬を加え、試薬を 1 つまたは複数の膜中に引き入れるために真空を施すステップと、
c. 1 つまたは複数のウェルに 1 つまたは複数の洗浄剤を加え、洗浄剤およびすべての非結合試薬を、分流器、1 つまたは複数の膜および多孔性支持体を通じて真空マニホールド中に引き入れるために真空を施すステップとを含む、プロセス。

【請求項 8】

ステップ (b) および (c) が、1 または複数回繰り返される、請求項 7 に記載のプロセス。

【請求項 9】

さらに、1 つまたは複数の生物学的存在を検出するステップ (d) を含む、請求項 7 に記載のプロセス。

【請求項 10】

さらに、放射性存在および比色分析存在からなる群から選択する検出メカニズムによる、1 つまたは複数の生物学的存在を検出するステップ (d) を含む、請求項 7 に記載のプロセス。

【請求項 11】

ステップ (b) の際、試薬が抗体であり、設定時間の間、真空を施すことなく 1 つまたは複数のプロットティング膜上 / 中で培養が可能になる、請求項 7 に記載のプロセス。

【請求項 1 2】

洗浄液または試薬含有液を、その中の少なくとも 1 つを検出する 1 つまたは複数の生物学的存在を含む 1 つまたは複数のプロットティング膜に通過させるプロセスであって、

a . 真空マニホールドと、真空マニホールド上に配置される多孔性支持体と、分流器と、分流器の上部上に配置される 1 つまたは複数のウェルとを設けるステップと、

b . 1 つまたは複数の生物学的存在を含む 1 つまたは複数のプロットティング膜を多孔性支持体上に配置するステップと、

c . 1 つまたは複数のプロットティング膜の上部上に分流器を配置し、分流器のウェルに液体を加えるステップと、 10

d . 1 つまたは複数のプロットティング膜を通じて液体を引き出すために真空を施すステップとを含む、プロセス。

【請求項 1 3】

洗浄液または試薬含有液を、その中の少なくとも 1 つを検出する 1 つまたは複数の生物学的存在を含むプロットティング膜に通過させるプロセスであって、

a . 回収マニホールドと、多孔性支持体と、支持体の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に配置される 1 つまたは複数のウェルと、正圧ガス源に接続されるその内部中への入口を有し、1 つまたは複数のウェルの上部上に取り外し可能に取り付けられる加圧キャップとを含むデバイスを設けるステップと、 20

b . 1 つまたは複数の生物学的存在を含むプロットティング膜の 1 つまたは複数の層を多孔性支持体上に配置するステップと、

c . プロットティング膜の 1 つまたは複数の層の上部上に分流器を配置し、分流器の 1 つまたは複数のウェルに液体を加えるステップと、

d . 入口からキャップに正圧を加え、ウェルからプロットティング膜の 1 つまたは複数の層を通してマニホールド中に液体を移動するステップとを含む、プロセス。

【請求項 1 4】

さらに、試薬回収のために、ホルダの下に回収トレイを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 5】

30

さらに、試薬回収のために、ホルダの下に回収トレイを含み、

トレイが、2 つ以上の別個のサブトレイに分割される、請求項 1 に記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2006 年 4 月 27 日出願の米国仮特許出願第 60 / 795 , 452 号および 2005 年 11 月 3 日出願の米国仮特許出願第 60 / 732 , 994 号に基づき優先権を主張する。

【0002】

本発明は、プロットティング膜中に含まれる物質の位置、または存在 / 不在を検出するための実験室デバイスおよびそのデバイスを使用するプロセスに関する。より詳しくは、それは、プロットティング膜に試薬および洗浄溶液を施し、真空または正圧を使用することによって、この検出を迅速に達成するための技術に関する。 40

【背景技術】

【0003】

現在、ゲル電気泳動の使用は、生体物質を分離するための、どこにでもある技術である。非生体物質は、ゲルまたは他のクロマトグラフの支援もまた使用して分離することもできるが、生体物に関する取り組み範囲は、より広い。通常の使用では、配列決定との関連または同質異像の検出のどちらかで様々なサイズの核酸フラグメントの分離、または他の観点からのサイズの検証が含まれる。さらに、しばしば実施されるのは、タンパク質およ 50

び糖タンパク質の分離、同質性または純度の検証時のゲル分離の実施である。

【0004】

これらの手順すべてにおいて、生物学的存在の混合サンプルが、電気泳動のゲルに施されて、成分が、ゲル両端間に加えられた電界によって分離される。ゲルを発現させる方法にかかわらず、その結果得られたサンプル中に含まれた物質の移動パターンは、何らかの方法で検出する必要がある。

【0005】

これを検出するために、通常、物質がゲル上に現れるパターンと同じパターンで物質が移送されるプロットング膜に、ゲル担体を接触させる。次いで、タンパク質または浄化液を用いて膜を遮断し、非特異性結合を減少させることによって（そうでなければ、ノイズのレベルが高く、検出レベルが低くなる）、「スポット」が少なくとも検出される。通常の遮断剤には、TBS-TまたはPBS-T溶液中に一般に約1～5%のカゼイン、ウシ血清アルブミン(BSA)および脱脂粉乳が含まれる。次いで、生物学的存在が、膜上で抗原に特異的な抗体を用いて培養される。次いで、膜は、十分に洗浄されて、すべての汚染物質(ゲル残留物など)、非結合遮断タンパク質や抗体その他が除去される。次いで、膜は、再び全体に洗浄され、すべての非結合二次抗体が除去される。次いで、一般に着色性、化学発光、蛍光性、放射性物質やストレプトアビジンの標識材料であり、酵素複合体と結合する、またはその基質である検出試薬が施される。最後に、適切な検出デバイスが、生物学的存在の存在、不在、位置、量等を決定するために使用される。一般に、上記の6つのステップが、選択された試薬と膜および生物学的存在との反応速度に依存して、3～6時間から一晩までかかる。プロセスには、揺動プラットフォーム上で、膜について複数の培養期間が必要である。それは、大部分の研究者が嫌悪し、大量の試薬を消費(浪費)する長いプロセスである。

10

20

【0006】

幾人かの研究者は、膜を通して残存流動体を引き出し、殊に洗浄ステップのプロセスの速度を向上させるために、ろ過紙など膜の下に配置する吸収材料の毛管現象を使用することを提案している。

【0007】

米国特許第5,155,049号には、Hoefer Scientific Instruments社から市販されているHybrid-Easeの混成チャンバと呼ばれるシステムが言及されている。このチャンバは、膜を挟む2つの格子を備える。格子プレートが、膜を囲繞する所定の位置に嵌め込まれ、注射器が、格子によって生成された開いたスペース中に嵌め込まれる。一方の注射器は、試薬および洗浄剤を施し、他方は、余分を回収するために使用される。システムは、動作するために大量の液体が必要であり、使用するには煩わしく、さらにとても時間がかかる。また、その特許は、ELISA検定など、いくつかの特定の検定では、小容積のウェル(96ウェルのマイクロタイタープレートなど)中に、洗浄ステップ中、1つまたは複数の膜を通して液体を引き出すために、真空が使用されていることを述べている。しかし、この試みが、小容積の用途のみで利用でき、また制御不能なものとして、軽視されている。彼等は、その代わり、より良好な方法は、ろ過紙および被覆層の上部上に膜を有する人力プレスを使用し、次いで2つのプレート間に挟まれた膜を押圧して、膜を通して紙中に液体を搾り出すことであると示唆している。

30

40

【0008】

プロットング膜上の生物学的材料または存在を検出するためのより効率的な方法が必要であることは、明らかである。本発明は、プロットング膜中の生物学的存在をより有効で効率的に検出することを可能にする。

【特許文献1】米国特許第5,155,049号

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

50

プロットティング膜上の１つまたは複数の生物学的存在を検出する迅速、効率的で好都合な方法が提供される。この検出は、１つまたは複数の膜上の生物学的物質の位置、性質やその量に関し得る。本発明の方法は、試薬を供給し除去するための正圧または真空中に支援されるレジメントから選択される圧力支援レジメントを含み、ならびに極めてわずかな量の液体を使用して、検出する膜中に埋もれた物質から汚染物質の洗浄を可能にする。この方法によって、プロットティング品質を損なうことなく、遮断、洗浄および抗体結合のステップを約３０～４５分で終了させることが可能になる。

【００１０】

したがって、一態様では、本発明は、抗体溶液、検出試薬や洗浄溶液などの液体を、検出する１つまたは複数の生物学的物質がその中に埋もれている１つまたは複数の膜に通過させる方法を対象とする。膜は、たとえば、電気泳動ゲル上で分離されるサンプルの移動パターンに対応し得る。膜は、特異結合検定の固体支持体になることもできる。

10

【００１１】

この方法は、サンプル中に含まれる材料の電気泳動分離または純度検証のために使用されているゲル支持体のプロットティングから得られる膜について、殊に有益である。

【００１２】

他の態様では、本発明は、本発明の方法を実施するのに有益な装置を対象とする。このデバイスは、プロットティング膜の１つまたは複数の層の下にある多孔性支持体層と、１つまたは複数のプロットティング膜の上にある分流器と、所望領域で液体を収容し、そのような液体の始動容積をより低くすることを可能にするための、分流器上のウェルとを含むいくつかの層から構成される。好ましくは、分流器は、０．２２ミクロン膜など、非結合または低結合の多孔性膜である。

20

【００１３】

デバイスは、分流器と支持体の間に取り付けられる１つまたは複数のプロットティング膜を有し、次いで適切な寸法の真空マニホールド上またはその中に配置される、あるいは加圧チャンバが分流器の上部の上に嵌め込まれる。次いでプロセスが、必要なステップ間で真空または正圧を使用し、膜を通して液体を移動させて実施される。

【００１４】

本発明の目的は、真空支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスであって、多孔性支持体と、多孔性支持体の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に取り付けられる１つまたは複数の試薬ウェルとを含むデバイスを提供することである。

30

【００１５】

本発明の他の目的は、正圧支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスであって、多孔性支持体と、多孔性支持体の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に取り付けられる１つまたは複数の試薬ウェルとを含むデバイスを提供することである。

【００１６】

本発明の他の目的は、真空支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスであって、真空マニホールドと、真空マニホールド上に取り付けられる多孔性支持体と、多孔性支持体の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に取り付けられる１つまたは複数の試薬ウェルとを含むデバイスを提供することである。

40

【００１７】

本発明のさらなる目的は、正圧支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスであって、マニホールドと、マニホールド上に取り付けられる多孔性支持体と、多孔性支持体上に配置される１つまたは複数のプロットティング膜と、１つまたは複数の多孔性膜の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に取り付けられる１つまたは複数の試薬ウェルと、分流器の上部上に取り外し可能に取り付けられる正圧デバイスとを含むデバイスを提供することである。

【００１８】

本発明のさらなる目的は、真空支援の免疫学的検定を実施するための、次のステップを含むプロセスを提供することである。

50

a．真空マニホールドと、真空マニホールド上に配置される多孔性支持体と、多孔性支持体上に配置される、検定する１つまたは複数の生物学的存在を含む１つまたは複数の膜と、膜の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に配置される１つまたは複数のウェルとを設けるステップ。

b．１つまたは複数のウェルに１つまたは複数の試薬を加え、試薬を膜中に引き入れるために真空を施すステップ。

c．１つまたは複数のウェルに１つまたは複数の洗浄剤を加え、洗浄剤およびすべての非結合試薬を分流器、膜および多孔性支持体を通して真空マニホールド中に引き入れるために真空を施すステップ。

d．所望または必要に応じてステップbおよびcを１または複数の追加の回数、繰り返すステップ。 10

【0019】

本発明の他の目的は、真空支援の免疫学的検定を実施するための、次のステップを含むプロセスを提供することである。

a．真空マニホールドと、真空マニホールド上に配置される多孔性支持体と、多孔性支持体上に配置される、検定する１つまたは複数の生物学的存在を含む１つまたは複数の膜と、膜の上部上に配置される分流器と、分流器の上部上に配置される１つまたは複数のウェルとを設けるステップ。

b．１つまたは複数のウェルに１つまたは複数の試薬を加え、試薬を膜中に引き入れるために真空を施すステップ。 20

c．１つまたは複数のウェルに１つまたは複数の洗浄剤を加え、洗浄剤およびすべての非結合試薬を、分流器、膜および多孔性支持体を通して真空マニホールド中に引き入れるために真空を施すステップ。

d．ステップbおよびcを１または複数の追加の回数、繰り返すステップ。

【0020】

本発明の目的は、洗浄液または試薬を含有する液体を、その中の少なくとも１つを検出する１つまたは複数の生物学的存在を含むプロットティング膜に通過させるプロセスであって、次の事項を含むプロセスを提供することである。

a．真空マニホールドと、真空マニホールド上に配置される多孔性支持体と、分流器と、分流器の上部上に配置される１つまたは複数のウェルとを設けるステップ。 30

b．１つまたは複数の生物学的存在を含む１つまたは複数のプロットティング膜を多孔性支持体上に配置するステップ。

c．１つまたは複数のプロットティング膜の上部上に分流器を配置するステップ。

d．分流器のウェルに液体を加え、分流器、１つまたは複数のプロットティング膜および多孔性支持体を通して液体をマニホールド中に引き出すために真空を施すステップ。

【0021】

本発明の目的は、洗浄液または試薬含有液体を、その中の少なくとも１つを検出する１つまたは複数の生物学的存在を含む１つまたは複数のプロットティング膜に通過させるプロセスであって、次の事項を含むプロセスを提供することである。

a．マニホールドと、マニホールド上に配置される多孔性支持体と、分流器と、分流器の上部上に配置される１つまたは複数のウェルとを設けるステップ。 40

b．１つまたは複数の生物学的存在を含む１つまたは複数のプロットティング膜を多孔性支持体上に配置するステップ。

c．１つまたは複数のプロットティング膜の上部上に分流器を配置するステップ。

d．分流器のウェルに液体を加え、分流器、１つまたは複数のプロットティング膜および多孔性支持体を通して液体をマニホールド中に移動させるために正圧を分流器に施すステップ。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本発明を実施するために、本発明によるデバイスが使用される。図１に示すように、デ 50

バイス 2 は、多孔性支持体 4 から構成される。好ましくは、支持体は、マニホールド 8（以下で述べる）中にまたはその上に嵌め込まれるように設計された縁部 6 または取り付けピースを有して形成される。プロットング膜 10 の 1 つまたは複数の層は、支持体 4 の上部上に配置される。次いで、分流器 12 は、プロットング膜 10 の上部上に配置または取り付けられる。分流器は、所望なら、分流器 12 の上部表面 16 に取り付けられた 1 つまたは複数のウェル 14（この実施形態では 1 つを示す）を有することができるか、あるいは、それは、分流器 12 の上部上に単に取り付けるまたは配置する別個の部品（図示せず）とすることができる。

【0023】

図 1 に示すように、この実施形態のマニホールド 8 は、真空源 20 に取り付けられるポート 18 を有する真空マニホールドである。あるいは、真空の代わりに正圧（以下にさらに述べる）を使用して、ろ過 / 洗浄プロセスを実施することができる。ポート 18 は、多孔性支持体 4 の下に位置決めされる。廃物回収デバイス 22 が、この例では容器であり、マニホールドの下に、または所望ならマニホールド中に（図示せず）取り付けられて、デバイス 2 から引き出された液体を回収する。あるいは、廃物回収デバイスは、廃物ドレインや当業者に知られるような他の類似のデバイスとすることができる。

10

【0024】

分流器 12 は、多孔性構造である。一実施形態（図示せず）では、構造全体が多孔性である。図 2 に示される他の実施形態では、分流器 12 A は、1 つまたは複数のウェル 14 内の領域 24 中のみ多孔性である。非多孔性の分流器 12 の領域 17 は、その領域 17 中の微細孔を、プラスチックや糊などの非多孔性材料で充填することによって、その領域 17 中の微細孔を、この分野でよく知られた熱および / または圧力および / または溶剤を用いて崩壊させるによって、あるいは 1 つまたは複数のウェル 14 の外側寸法のサイズに一致するように分流器 12 を形成し、その外側寸法に沿って 1 つまたは複数のウェル 14 の底部に分流器 12 を液密に密封することによって、そのようにすることができる。

20

【0025】

分流器 12 は、その面全体にわたって液体を均一に配給し、真空の影響下において容易な移動を可能にするのに十分多孔性であり、液体からの凝集体、粒子や他の破片をろ過除去することもできる、任意の多孔性構造とすることができる。

【0026】

30

分流器は、任意の所望のサイズにすることができる。ゲルは、約 $7 \times 8 \text{ cm}$ から $20 \times 20 \text{ cm}$ までの範囲で様々な「標準」サイズで入ってくる。

【0027】

そのような材料には、これらに限定されないが、TYVEK（登録商標）または TYPAR（登録商標）ペーパーなど織布、不織布や繊維の多孔性ろ過材、米国マサチューセッツ州ビルリカ（Billerica）の Millipore Corporation 社製の MILLISTAK+（登録商標）ろ過材などのセルロース誘導体材料、微小孔性膜などの膜、POREX（登録商標）ろ過材などの焼結膜その他が含まれる。好ましいのは、膜、殊にプラスチックの微小孔性膜である。

【0028】

40

そのような膜の好ましい孔径は、約 0.1 と約 0.65 マイクロメートルの範囲であり、好ましくは 0.2 と約 0.45 マイクロメートルの範囲であり、より好ましくは約 0.22 マイクロメートルである。

【0029】

さらに、好ましいろ過材または膜は、使用量を最小にするために、使用する試薬に対して低結合特性を有している。ろ過材または膜は一般に生体物質とともに使用されるので、親水性であり、低タンパク質結合特性を有することがより好ましい。1 つのそのような分流器は、Millipore Corporation 社製の、PVDF から形成される親水性 DURAPORE（登録商標）膜である。他は、同社製の MILLIPORE EXPRESS の親水性 PES 膜である。

50

【 0 0 3 0 】

多孔性支持体 4 は、簡単なスクリーン、格子、または P O R E X (登録商標) 膜などの焼結多孔性構造または不織布のペーパーなど粗いまたは大きい、穴あけされた微小孔性ろ過材、ポリプロピレンまたはポリエチレンの繊維、または 1 ~ 1 0 ミクロンの微小孔性ろ過材とすることができる。そのような支持体は、ポリマー、セラミックまたは、金属材料、これらに限定されないが、たとえば、ステンレス鋼、鋼、合金鋼、アルミニウムなどの金属、およびポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスルホン、スチレン、ナイロンなどのポリマーから製作することができる。

【 0 0 3 1 】

図 3 に、標準真空マニホールド 3 0 を使用する実施形態を示す。この例では、マニホールドは、プラスチックまたは金属の格子、あるいはプラスチックまたは金属の多孔性焼結シート、あるいは真空技術の分野でよく知られる他の同様なデバイスなどの多孔性支持体構造 3 2 を有する。プロットティング膜 3 4 は、やはり支持体 3 2 の上部上に配置され、図 1 および 2 の実施形態について上記で述べたように、分流器 3 6 およびウェル構造 3 8 によって覆われる。

10

【 0 0 3 2 】

図 4 に、本発明中で使用することができる正圧システムを示す。構成要素が図 1 ~ 3 の構成要素と同じである範囲で、同じ参照番号が使用されている。

【 0 0 3 3 】

図 4 に示すように、デバイス 2 A は、多孔性支持体 4 から構成される。好ましくは、支持体は、マニホールド 8 中にまたはその上に嵌め込まれるように設計された縁部 6 または取り付けピースを有して形成される。プロットティング膜 1 0 の 1 つまたは複数の層 (1 つを示す) は、支持体 4 の上部上に配置される。次いで、分流器 1 2 は、プロットティング膜 1 0 の上部上に配置または取り付けられる。分流器 1 2 は、分流器 1 2 の上部表面 1 6 に取り付けられた 1 つまたは複数のウェル 1 4 (この実施形態では 1 つを示す) を有することができるか、あるいは、それは、分流器 1 2 の上部上に単に取り付けるまたは配置する別個の部品 (図示せず) とすることができる。正圧マニホールドまたはカバー 1 3 が、ウェル 1 4 および / または分流器 1 2 の上に配置され、好ましくはそれらに取り外し可能に固定される。正圧マニホールド 1 3 は、チューブ 1 7 を介して正圧源に接続されるポート 1 5 を有する。正圧は、ポンプ、与圧ガス源 (タンク、小型容器その他) や実験室または産業で

20

30

【 0 0 3 4 】

図 4 に示すように、マニホールド 8 は、過剰圧を逃がすために使用することができるポート 1 8 を有する、単に回収マニホールドである。所望の場合、マニホールド 8 は、汚染の侵入を防ぐために、エアフィルタを含むことができる。ポート 1 8 は、多孔性支持体 4 の下に位置決めされる。廃物回収デバイス 2 2 は、この例では、容器であり、マニホールドの下に、または所望ならマニホールド中に (図示せず) 取り付けられ、デバイス 2 から引き出された液体を回収する。あるいは、廃物回収デバイスは、廃物ドレインまたは当業者に知られる他の同様なデバイスとすることができる。

【 0 0 3 5 】

本発明では様々な方法を使用することができる。キー要素は、それらすべてが、過去に行われたような静的拡散でなく、真空または正圧に駆動される液体ろ過作用に頼っているということである。

40

【 0 0 3 6 】

最も簡単な方法は、 1 つまたは複数の洗浄サイクルを実施するために、単に本発明を使用することである。通常、各洗浄サイクルは、 1 つまたは複数の洗浄ステップから構成される。一般に、 2 ~ 5 のステップが 1 サイクル当たり実施される。

【 0 0 3 7 】

他の方法は、抗体の培養後または洗浄ステップ中など、プロットティング膜から液体を除去することが必要である各ステップで、本発明を使用することである。

50

【0038】

これらのプロセスすべてにおいて、デバイスからマニホールド中に1つまたは複数の液体を移動するのに適した任意の圧力を使用することができる。これは、プロットティングに選択される膜、分流器、使用するマニホールド、ろ過作用の所望速度および研究者に利用できる真空または正圧源に依存して変えることができる。

【0039】

一般に、使用できる真空は、100から760 mmHg (133ミリバール~1013ミリバール)の範囲で変えることができる。バルブや圧力絞りその他の使用については、使用する膜の許容範囲内に真空を保つために、使用することもできる。本発明の一実施形態の好ましい真空マニホールドは、STERICUP (登録商標)の真空ベースのデバイスであり、約100 mmHg (133ミリバール)の真空を使用する。他の適切な真空マニホールドには、これらに限定されないが、Millipore Corporation社製のMULTISCREEN (登録商標)およびMULTISCREEN (登録商標) H_{TS} 真空マニホールドが含まれる。

10

【0040】

一般に、正圧は、約2から15 psi (13.8×10^3 Pa ~ 103×10^3 Pa)の範囲の圧力で送気管から供給される。バルブや圧力リストラクタその他の使用については、使用する膜の許容範囲内に圧力を保つために、使用することもできる。そのような圧力システムには、これらに限定されないが、Millipore Corporation社製のAmicon (登録商標)のセル攪拌デバイスおよび米国マサチューセッツ州ホプキントン (Hopkinton) のCaliper Life Sciences社製の正圧ろ過ユニットが含まれる。

20

【0041】

図5A~5Cに、ブロック図で通常のプロセスを示す。

【0042】

図5Aにおいて、ステップ50で、本発明によるデバイスが設けられ、真空マニホールドおよび真空源に取り付けられる。ステップ52で、1つまたは複数のプロットティング膜は、適切な位置でデバイス中に配置される。好ましくは、ステップ52の1つまたは複数のプロットティング膜は、予め湿らせる (図示せず)。ステップ54で、真空がオンにされ、洗浄液などを含んだ液体が、1つまたは複数のウェル中にセットされる。ステップ56で、液体がデバイスから引き出されるまで、真空状態が継続され、次いで真空がオフにされる。1つより多いプロットティング膜を使用するとき、それらは、互いの上部上に順次配列することができ、1回のプロセスステップで、同じ所望の試薬を含む十分な液体を複数の層を通して容易に移動することができる。一般に、1層より多い層を使用するとき、同時に、2から10層の範囲で、好ましくは2から5層の範囲で使用することが好ましい。あるいは、複数のウェルを有する分流器を使用し、1つより多いプロットティング膜を互いに並行に使用することができ、それぞれが分流器中にそれ自体のウェルを有し、それぞれが、その特定の目的のために必要なそれ自体の一式の試薬を有する。所望なら、隣接したウェル中で複数の層を使用することさえできる。

30

【0043】

図5Bでは、ステップ54が省略されて、液体は、ステップ58で真空でない状態で加えられ、一次または二次抗体によって必要になることがあるので、培養が可能にされる。次いで、ステップ60で、真空がオンにされる。

40

【0044】

図5Cでは、図5Aおよび5Bのステップが、連続するステップとして組み合わされる。どちらか、または両方のステップは、必要とあれば繰り返すことができ、または適切なプロセスを実施するのに望ましい異なる順序に配列することができる。

【0045】

任意選択で、所望であれば、膜の支持体の下に、好ましくはマニホールド自体中にパンまたは単一ウェルデバイスを配置することができる。次いで、それは、高価であることがあ

50

り、将来の検定に再使用することができる単一の非結合試薬を回収するために使用することができる。任意選択で、それは、2つ以上のサブトレイに分割することができる。

【0046】

他のプロセスは、本発明のデバイスとともに使用することもできる。

【0047】

使用する抗体濃度は、実験設計に依存して変わるが、 $10 \sim 1,000 \text{ ng/mL}$ が、標準方法のための典型的な範囲である。必要な溶液量は、典型的には、遮断、抗体反応および洗浄それぞれについて、 0.1 mL/cm^2 、 0.03 mL/cm^2 および 1.0 mL/cm^2 である。

【0048】

膜は、その間隔に、検出する1つまたは複数の物質を含む。一般に、これらの物質は、通常抗体や特定タンパク質など特別のタイプの材料の存在、不在やその量を検出する、すなわち上記で述べたようにドットプロット式(Dot-Blot type)の検定の目的で、電気泳動またはクロマトグラフのために固体支持体からプロットイングされたことによって、あるいは直接施されたことによって、どちらかの間隔に存在する。しかし、膜の定義は、これらの例に限定されないが、1つまたは複数の膜が、その間隔に検出する1つまたは複数の物質を含む、任意のケースに適用される。本発明中で使用されると想定される膜のタイプに含まれるのは、ニトロセルロースなどの電気泳動ゲル、ナイロンや、フッ化ポリビニリデン(PVDF)、Millipore Corporation社製のIMMOBILON(登録商標)膜として市販される膜など、様々な他の重合体膜をプロット

10

20

【0049】

この技術分野で理解されているように、様々なサンプル上で行われる電気泳動ゲルの結果を複写するために、様々な材料を使用することができる。最も一般的には、サンプルは、個々のタンパク質、抗体、核酸、オリゴヌクレオチドや複合糖質その他などの生物学的存在を含むが、技術の応用はこれらの物質に限定されない。本発明の技術は、膜の化学的組成または目標とされる物質にかかわらず、その中に検出する物質を含む任意の膜に適用可能である。

【0050】

電気泳動の結果の転写を表す膜を使用するとき、ゲルから膜への検出する物質の移送は、移送バッファを含む膜を使用することによって、電子溶出(electroelution)、電子プロットイング(electroblotting)によって、またはゲルの半乾燥プロットによって、実施することができる。これらの移送のための技術は、この技術でよく理解され、本明細書の本発明の一部を構成しない。

30

【0051】

供給される液体は、検出試薬を含むことができ、または単に洗浄液として供給することができる。もちろん、検出試薬の性質は、検出する物質に依存する。通常、タンパク質は、抗原と抗体の間の免疫反応、またはその免疫反応性部分によって検出され、通常、核酸フラグメントの存在が、適切なオリゴヌクレオチドプローブによって検出される。検出する物質との直接または固有の反応に関与する検出物質は、必要ならラベルによってさらに補足することができ、検出試薬の多様な応用が、必要になることがあり、たとえばプロトコルが、酵素、たとえば通常ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼによってラベル付けられる抗体を供給することによって、抗原の検出を含むことができ、次いで、この結合が、この酵素のための基質を供給することによって、検出される。試薬の適用では、好ましくはないが、正に押圧されたドナーマトリックスのみを使用して、定められた期間、膜のこの構成要素を暴き出すことが可能である。

40

【0052】

室温で本発明の方法を実施することが、最も好都合であるが、温度を上げる、または下げることができる。これは、デバイスや、その周囲環境(加熱ボックスまたは冷却ボックス中にして)を加熱することによって、達成することができる。

50

【0053】

プロットは、本デバイスおよびプロセスで、既に結合した抗体をプロットから剥離し、次いでその後他の目標タンパク質に特異的な抗体または他のプローブを用いて培養することによって、複数の抗体やプローブを用いて連続的に解析することができる。剥離プロセスは、抗原・抗体の結合を崩壊させ、抗体を圍繞バッファ中に溶解させる。これは、通常、洗浄剤および熱の組み合わせによって、または高または低pHどちらかに曝すことによって達成される。デバイスは、分流器と共同して、高または低pH法を使用してプロットの剥離を可能にする。プロットのそれに続く再精査は、直接（たとえば剥離に使用された分流器と同じ分流器を使用する）または保管後に続いていずれかで、最初の精査と同じプロトコルを使用することになる。プロットを剥離するための適切なキットは、Chemicon International Inc. から入手できる、商標が、ReBlot Plusキット（カタログ#2500）、ReBlot Plus - Mild溶液（カタログ#2502）およびReBlot Plus - Strong溶液（カタログ#2504）である。

10

【0054】

標準のウェスタンブロットでは、抗原または目標は、1つまたは複数の膜支持体に移送され、抗体、タンパク質（たとえばタンパク質A）やレクチン（炭水化物の構成成分と結合するタンパク質または糖タンパク質）など適切なプローブを用いて精査される。いくつかの応用では、逆フォーマット（たとえば逆アレイ）が使用され、抗体または他のプローブが、1つまたは複数の膜上にまたは他の支持体上に（通常、アレイフォーマットで）点として現れ、抗原または目標は、アレイ上に固定された抗体で提示される。目標プローブの結合事象の視覚化は、抗原または目標のラベル付けによって、または目標に特異的な二次抗体を使用することによって達成することができる。逆アレイは、目標の混合物、たとえば異なる蛍光色でラベル付けられた溶解物をしばしば用いて、並行処理を可能にする。逆検定は、本発明によって実施することもできる。

20

【実施例】

【0055】

図1のデバイスは、真空マニホールドとしてSTERICUP（登録商標）デバイス（米国マサチューセッツ州ビルリカ（Billerica）のMillipore Corporation社製）のベースと、多孔性支持体としてPorex（登録商標）多孔性プラスチックのピースと、分流器として孔径0.22ミクロンのDurapore（登録商標）親水性膜（GVPP）と、ポリスチレンのストリップを90°で折り曲げて4つの隅部を形成し、（Locctite社製の3211光硬化式接着剤）を使用してそのストリップの末端部を互いに封止して形成されるポリスチレンストリップウェル（通常、膜サイズより4mm大きい。たとえば、72mm（L）×82mm（W）に対して76mm（L）×86mm（W）×25mm（H））とを使用して製作された。このウェルは、Locctite社製の3211光硬化式接着剤を使用して膜表面に接着された。

30

【0056】

ベースは、バルブ付きの真空ラインにその真空ポートを介して接続された。

【0057】

ウシの肝臓の溶解物のサンプルを含む予め湿潤させた（100%メタノール中、次いで水中で予め湿潤）プロットティング膜（米国マサチューセッツ州ビルリカ（Billerica）のMillipore Corporation社製のIMMOBILION（登録商標）Westernプロットティング膜）が、ベース上に置かれて、ベースと膜の間の気泡がすべて除去された。分流器が、プロットティング膜の上部上に配置された。ベースと膜の間の気泡は、すべて除去された。133ミリバール（100mmHg）の真空が施され、次いで遮断溶液（TBS-T（Tris緩衝生理食塩およびTween（登録商標）—20界面活性剤；20mM Tris-Cl、pH7.6、0.8%塩化ナトリウム、0.1% Tween（登録商標）—20界面活性剤）中に1%のカゼイン）10mLがウェルに加えられた。次いで真空がオフにされた。希釈されたウサギ抗ERK一次抗体1

40

50

m L (T B S - T 中 1 % カゼインを用いて 1 : 2 , 0 0 0 に希釈) がウェルに加えられ、どのような真空状態でもなく 1 0 分間放置して培養された。1 3 3 ミリバール (1 0 0 m m H g) の真空を施して残された抗体溶液を濾過した。T B S - T 洗浄液 3 0 m L が加えられ、真空下で濾過された (乾燥するまで) 。それぞれ T B S - T 洗浄液 3 0 m L 、 3 回 T B S - T 洗浄溶液を追加して順番に加え、真空下で濾過した。次いで、真空がオフにされて、希釈された二次抗体 (アルカリ性リン酸塩合成ヤギ抗ウサギ I g G 抗体) (T B S - T 中 1 % カゼインを用いて 1 : 1 , 0 0 0 に希釈) 1 m L がウェルに加えられ、真空状態でなく 1 0 分間放置して培養された。次いで真空が 1 3 3 ミリバール (1 0 0 m m H g) で施され、残された二次抗体溶液が分流器を通して濾過された。4 回連続して洗浄溶液、それぞれ T B S - T 洗浄溶液 3 0 m L が加えられ、真空下で濾過され、次いで真空がオフにされた。基質 (I m m o b i l o n (登録商標) W e s t e r n A P 試薬) がウェルに加えられ、検出した。膜が、X 線フィルムに 1 分間曝され、フィルムがフィルム現像液によって処理されて仕上げられた。

10

【 0 0 5 8 】

従来の方法、同じタイプの膜、タンパク質 (E R K) および試薬を使用して比較例が 3 時間を越えて実施された。

- 1 . 1 時間、1 % カゼイン / T B S - T 中で膜を遮断する (0 . 1 m L / c m ² 膜) 。
- 2 . 抗 E R K 抗体 (T B S - T 中 1 % カゼインを用いて 1 : 1 0 , 0 0 0 に希釈) を 1 時間加える (0 . 1 m L / c m ² 膜) 。
- 3 . T B S - T で 5 分間 4 回洗浄する (1 . 0 m L / c m ² 膜) 。
- 4 . 二次抗体 (アルカリ性リン酸塩合成抗ウサギ I g G ; T B S - T 中 1 % カゼインを用いて 1 : 5 , 0 0 0 に希釈) を 1 時間加える (0 . 1 m L / c m ² 膜) 。
- 5 . T B S - T で 5 分間 4 回洗浄する (1 . 0 m L / c m ² 膜) 。
- 6 . I m m o b i l o n (登録商標) W e s t e r n A P 試薬を加え、5 分間培養する (0 . 0 5 m L / c m ² 膜) 。
- 7 . X 線フィルムに 1 分間曝し、次いでフィルム現像に進む。

20

【 0 0 5 9 】

図 6 に、比較例と本発明のデバイスおよびプロセスによる実施例を示す。この図によって、3 0 分間のみで得られる高品質の検出が実証される。さらに、使用する抗体量は、従来のプロセスに比べて、従来例の 1 / 1 0 の容積で濃度が 5 倍増加したにもかかわらず、本発明のプロセスでは半分に減少した。これによって、研究者がより多く実験することが可能になるだけでなく、より少ない試薬を用いて実験しより高い品質の結果が得られる。さらに、バックグラウンドノイズが、従来方法に比べて著しく減少した。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 0 】

【 図 1 】 本発明によるデバイスの第 1 の実施形態を示す断面図である。

【 図 2 】 本発明によるデバイスの第 2 の実施形態を示す断面図である。

【 図 3 】 本発明によるデバイスの第 3 の実施形態を示す断面図である。

【 図 4 】 本発明によるデバイスの第 4 の実施形態を示す断面図である。

【 図 5 A 】 本発明によるプロセスの実施形態をブロック図の形で示す図である。

40

【 図 5 B 】 本発明によるプロセスの実施形態をブロック図の形で示す図である。

【 図 5 C 】 本発明によるプロセスの実施形態をブロック図の形で示す図である。

【 図 6 】 従来技術および本発明によって処理されたプロットの実施例の結果を示す図である。

【 符号の説明 】

【 0 0 6 1 】

2、2 A デバイス

4 多孔性支持体

6 縁部

8 マニホルド

50

- 10、34 プロッティング膜
- 12、36 分流器
- 13 正圧マニホールドまたはカバー
- 14 ウェル
- 15、18 ポート
- 16 上部表面
- 17 チューブ
- 20 真空源
- 22 廃物回収デバイス
- 30 標準真空マニホールド
- 32 多孔性支持体構造
- 38 ウェル構造

10

【図1】

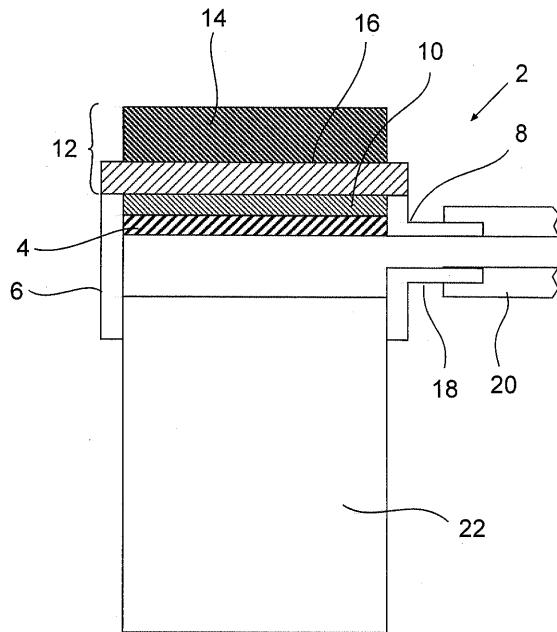


Figure 1

【図2】

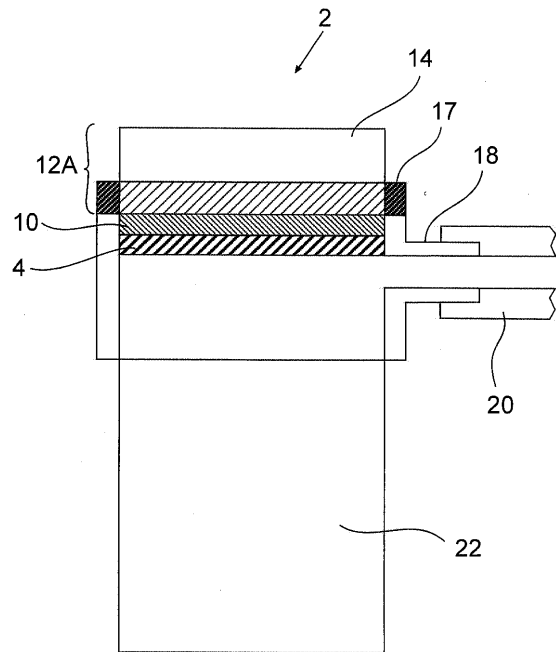


Figure 2

【図 3】

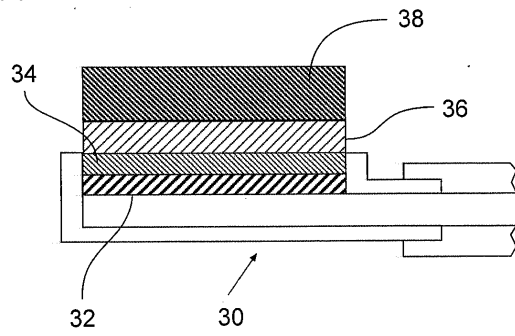


Figure 3

【図 4】

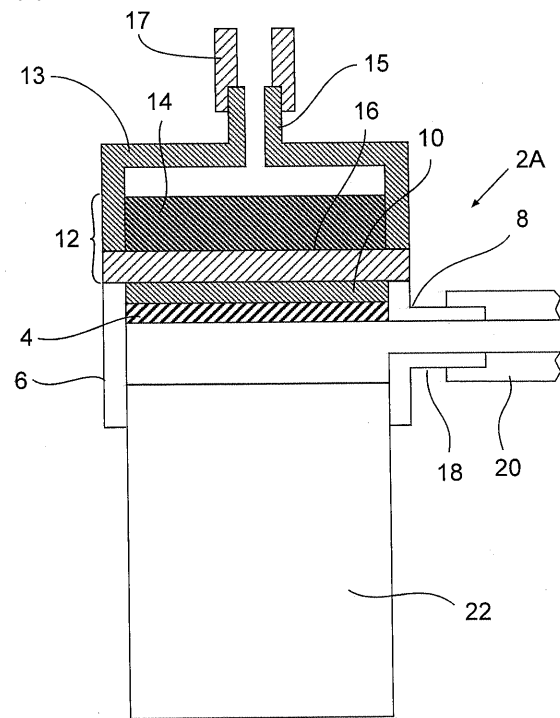


Figure 4

【図 5 A】

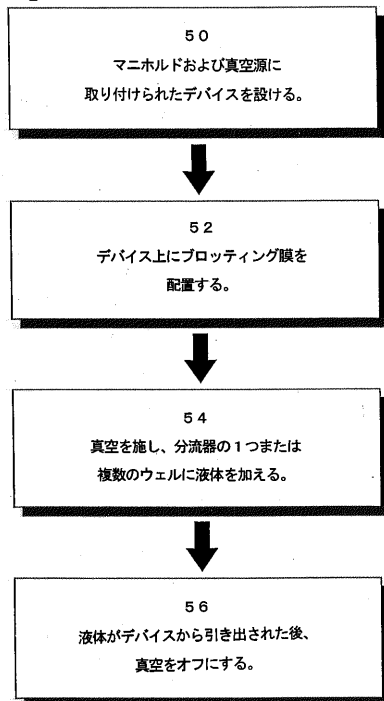


Figure 5A

【図 5 B】

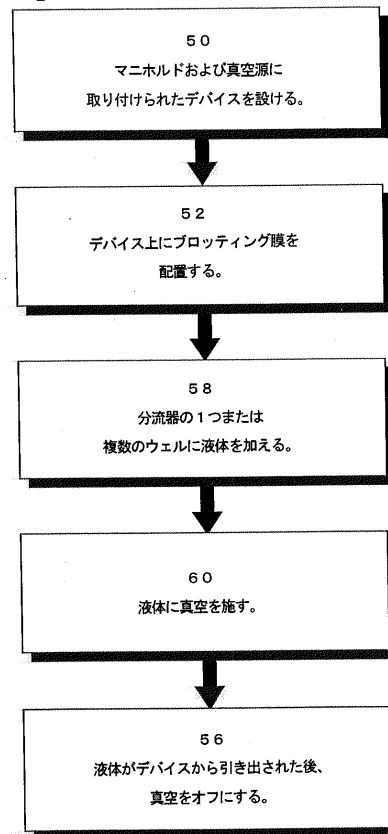


Figure 5B

【図 5 C】

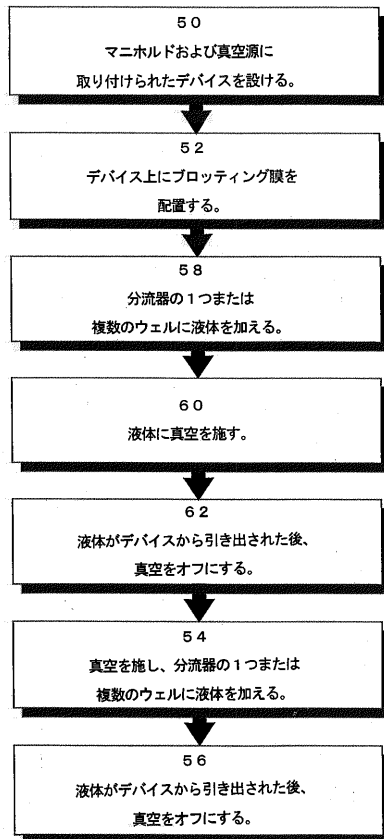
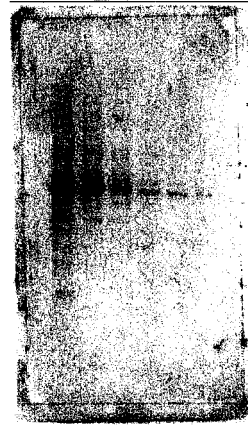


Figure 5C

【図 6】



実施例



比較例

Figure 6

フロントページの続き

- (74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
- (74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
- (72)発明者 馬淵 昌治
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01915、ピバリー、レキシントン・ドライブ・29
- (72)発明者 木村 浩子
神奈川県横浜市青葉区千草台13-1-103
- (72)発明者 マーク・エメリツク
アメリカ合衆国、ニュー・ハンプシャー・03870、ライ、クラーク・ロード・167
- (72)発明者 フィリップ・クラーク
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01880、ウエイクフィールド、リチャードソン・アベニュー・14
- (72)発明者 クルト・グリーニゼン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01835、ブラッドフォード、セーラム・ストリート・332、ユニット・2

【外国語明細書】

Specification

Title of Invention

IMMUNOASSAY PRODUCT AND PROCESS

Cross-Reference to Related Applications

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/795,452, filed on April 27, 2006 and U.S. Provisional Application No.: 60/732,994, filed on November 3, 2005.

The invention relates to a laboratory device and process of using the device to detect the position of or presence/absence of substances that are contained in a blotting membrane. More particularly, it concerns a technique for applying reagents and wash solutions to a blotting membrane to accomplish this detection quickly via the use of a vacuum or positive pressure.

Background of the Invention

The use of gel electrophoresis is currently the ubiquitous technique for the separation of biological materials. (Nonbiological materials can also be separated using gels or other chromatographic supports as well, but the scope of effort with regard to biologicals is greater.) Typical applications include separation of nucleic acid fragments of various sizes either in the context of sequence determination; in the detection of polymorphisms; or verification of sizes in other contexts. Also frequently conducted are separations of proteins and glycoproteins and application of gel separations as verification of homogeneity or purity.

In all of these procedures, mixed samples of biological entities are applied to electrophoretic gels and the components are separated by application of an electric field across the gel. Regardless of the manner in which the gel is developed, the resulting pattern of migration of the substances contained in the sample must be detected in some manner.

To conduct this detection, typically the gel support is contacted with a blotting membrane to which the substances are transferred in the same pattern in which they appeared on the gel. The "spots" are then detected by, at a minimum, by blocking the membrane with a protein or detergent solution to reduce non-specific binding (which otherwise leads to a high level of noise and low level of detection). Typical blocking agents include casein, bovine serum albumin (BSA), non-fat dry milk (generally about 1%) in a TBS-T or PBS-T solution. The biological entity is then incubated with an antibody specific for the antigen on the membrane. The membrane is then

extensively washed to remove any contaminants (such as gel residues), unbound blocking proteins or antibodies and the like. The membrane is then treated and incubated with a secondary enzyme-, radioisotope-, fluorfluor-, or biotin-conjugated antibody specific for the primary antibody. The membrane is then extensively washed again to remove any unbound secondary antibody. Then a detector reagent, generally a chromogenic, chemiluminescent, fluorescent, radiological, or streptavidin-labeled material, is applied which either binds to, or is a substrate of the enzyme-conjugate. Lastly, the appropriate detection device is used to determine the presence, absence, position, quantity, etc of the biological entity. The last six steps generally take from 3-6 hours to overnight depending upon the speed of the reaction between the selected reagents, the membrane and the biological entity and the process requires multiple incubation periods of the membrane on a rocking platform. It is a lengthy process that most researchers dislike and which consumes (wastes) a large volume of reagents.

Some researchers have suggested the use of the capillary action of an absorbent material such as filter paper placed below the membrane to draw the remaining fluids through the membrane and improve the speed of the process especially the washing steps.

US 5,155,049 mentions a system called the Hybrid-Ease™ hybridization chamber marketed by Hoefer Scientific Instruments. This chamber comprises two grids between which the membrane is sandwiched. The grid plates are snapped into position surrounding the membrane, and syringes fitted into the open space created by the grids. One syringe is used to apply reagents and wash, and the other to withdraw excess. The system requires large volumes of liquid in order to operate, is cumbersome to employ and is still quite time consuming. It also mentions that in some particular assays, such as ELISA assays, in small volume wells (such as 96 well microtiter plate), others have used vacuum to draw liquids through one or more membranes in a washing step. However, they discount this effort as it is only available in small volume applications and still is uncontrollable. They suggest instead that the better method is to use a manual press having the membrane on top of a filter paper and cover layer and then pressing the membrane sandwich between two plates to squeeze the liquid through the membrane and into the paper.

It is clear that a more efficient method for detection of the biological materials or entities on blotting membranes is required. The present invention permits a more effective and efficient detection of biological entities in a blotting membrane.

Summary of the Invention

A rapid, efficient and convenient method to detect one or more biological entities on a blotting membrane is provided. The detection can relate to the position, nature or amount of the biological substance on one or more membranes. The invention method involves a pressure assisted regimen, selected from positive pressure or a vacuum assisted regimen for the supply and removal of reagents and permits washing of the contaminants from substances embedded in the membrane to be detected using very low volumes of liquid. This method enables completion of the blocking, washing and antibody binding steps in about 30-45 minutes without comprising blot quality.

Thus, in one aspect, the invention is directed to a method to pass liquid, such as an antibody solution, detection reagent or wash, through one or more membranes in which one or more biological substances to be detected are embedded. The membrane may, for example, correspond to the migration pattern of a sample subjected to separation on an electrophoresis gel. The membrane may also be a specific-binding assay solid support.

This method is particularly useful for membranes that are obtained by blotting of a gel support which has been used for electrophoretic separation of materials contained in a sample or verification of purity.

In another aspect, the invention is directed to an apparatus useful in conducting the method of the invention. The device comprises of several layers including a porous support layer below the one or more layers of blotting membrane, a flow distributor above the blotting membrane(s) and a well on the flow distributor to contain the liquid to the desired area and to allow for lower starting volumes of such liquid. Preferably, the flow distributor is a non-binding or low binding porous membrane such as a 0.22 micron membrane.

The device has one or more blotting membranes mounted between the flow distributor and the support and is then placed on or into a vacuum manifold of suitable dimensions or a pressure chamber is fit over the top of the flow distributor. The process is then run with the use of vacuum or positive pressure between the necessary steps to move the liquid through the membrane.

It is an object of the present invention to provide a device for conducting vacuum assisted immunoassays comprising a porous support, a flow distributor placed on top of the porous support and one or more reagent wells mounted on top of the flow distributor.

It is another object of the present invention to provide a device for conducting positive pressure assisted immunoassays comprising a porous support, a flow distributor placed on top of the porous support and one or more reagent wells mounted on top of the flow distributor.

It is another object of the present invention to provide a device for conducting vacuum assisted immunoassays comprising a vacuum manifold, porous support mounted on the vacuum manifold, a flow distributor placed on top of the porous support and one or more reagent wells mounted on top of the flow distributor.

It is a further object of the present invention to provide a device for conducting positive pressure assisted immunoassays comprising a manifold, porous support mounted on the manifold, one or more blotting membranes placed on the porous support, a flow distributor placed on top of the one or more porous membranes, one or more reagent wells mounted on top of the flow distributor and a positive pressure device removably mounted on top of the flow distributor.

It is a further object of the present invention to provide a process for conducting vacuum assisted immunoassays comprising the steps of:

- a. providing a vacuum manifold, a porous support placed on the vacuum manifold, one or more membranes containing one or more biological entities to be assayed, the membrane being placed on the porous support, a flow distributor placed on top of the membrane and one or more wells placed on top of the flow distributor,
- b. adding one or more reagents to the one or more wells and applying a vacuum to pull the reagents into the membrane, and
- c. adding one or more washing agents to the one or more wells and applying a vacuum to pull the washing agents and any unbound reagents through the flow distributor, membrane and porous support and into the vacuum manifold.
- d. repeating steps (b and c) one or more additional times as desired or required.

It is another object of the present invention to provide a process for conducting vacuum assisted immunoassays comprising the steps of:

- a. providing a vacuum manifold, a porous support placed on the vacuum manifold, one or more membranes containing one or more biological entities to be assayed, the membrane being placed on the porous support, a flow distributor placed on top of the membrane and one or more wells placed on top of the flow distributor,

- b. adding one or more reagents to the one or more wells and applying a vacuum to pull the reagents into the membrane,
- c. adding one or more washing agents to the one or more wells and applying a vacuum to pull the washing agents and any unbound reagents through the flow distributor, membrane and porous support and into the vacuum manifold, and
- d. repeating steps (b and c) one or more additional times.

It is an object of the present invention to provide a process of passing a wash or reagent-containing liquid through a blotting membrane containing one or more biological entities, at least one of which is to be detected wherein the process comprises:

- a. providing a vacuum manifold, a porous support placed on the vacuum manifold, a flow distributor and one or more wells placed on top of the flow distributor,
- b. placing the one or more blotting membranes containing the one or more biological entities on the porous support,
- c. placing the flow distributor on top of the blotting membrane(s),
- d. adding a liquid to the well of the flow distributor, and applying a vacuum to draw the liquid through the flow distributor, blotting membrane(s) and porous support into the manifold.

It is an object of the present invention to provide a process of passing a wash or reagent-containing liquid through one or more blotting membranes containing one or more biological entities, at least one of which is to be detected wherein the process comprises:

- a. providing a manifold, a porous support placed on the manifold, a flow distributor and one or more wells placed on top of the flow distributor,
- b. placing the one or more blotting membranes containing the one or more biological entities on the porous support,
- c. placing the flow distributor on top of the blotting membrane(s),
- d. adding a liquid to the well of the flow distributor, and applying a positive pressure to the flow distributor to move the liquid through the flow distributor, blotting membrane(s) and porous support to the manifold.

Detailed Description of the Invention

In order to accomplish the present invention a device according to the present invention is used. As shown in Figure 1, the device 2 is comprised of a porous support 4. Preferably the support is formed with an edge 6 or mounting piece that is designed to fit into or onto a manifold 8 (described below). One or more layers of a blotting membrane 10 are placed on top of the support 4. A flow distributor 12 is then placed or mounted on top of the blotting membrane 10. The flow distributor may if desired either have one or more wells 14 (one shown in this embodiment) attached to the top surface 16 of the flow distributor 12 or it may be a separate piece (not shown) which is simply attached or placed on top of the flow distributor 12.

As shown in Figure 1, the manifold 8 in this embodiment is a vacuum manifold which has a port 18 that is attached to a source of vacuum 20. Alternatively, positive pressure (to be described further below) can be used instead of a vacuum to drive the filtration/washing process. The port 18 is located below the porous support 4. A waste collection device 22, in this instance, a receptacle, is mounted below the manifold or if desired in the manifold (not shown) to collect the liquid pulled through the device 2. Alternatively, the waste collection device can be a waste drain or other similar device as is known to one of ordinary skill in the art.

The flow distributor 12 is a porous structure. In one embodiment (shown) the entire structure is porous. In another embodiment shown in Figure 2, the flow distributor 12A is only porous in the area 24 within the well(s) 14. The area 17 of the distributor 12 that is non-porous can be rendered so by filling the pores in that area 17 with a non-porous material such as a plastic or a glue, by collapsing the pores in that area 17 with heat and/or pressure and/or solvents as is well known in the art or by forming the distributor 12 to match the size of the outer dimension of the well(s) 14 and liquid tightly sealing the distributor 12 to the bottom of the well(s) 14 along its outer dimension.

The flow distributor 12 may be any porous structure that provides for even distribution of the liquid across its face and which is sufficiently porous to allow for easy movement under the influence of a vacuum and which is also capable of filtering out agglomerates, particles and other debris from the liquid.

The flow distributor may be of any desired size. Gels come in a variety of "standard" sizes from about 7cm by 8cm to a 20cm by 20cm area.

Such materials include but are not limited to woven, non-woven and fibrous porous filters such as TYVEK® or TYPAR® paper, cellulosic materials such as MILLISTAK+® filters available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts, membranes such as microporous membranes, sintered membranes such as POREX® filters and the like. Preferred are membranes, especially plastic microporous membranes.

A preferred pore size of such membranes is between about 0.1 and about 0.65 micrometer, preferably between 0.2 and about 0.45 micrometer and more preferably about 0.22 micrometer.

Additionally, the preferred filter or membrane has low binding characteristics for the reagents used in order to minimize the amount used. More preferably, as it is generally used with biological materials it is hydrophilic and has low protein binding characteristics. One such distributor is a hydrophilic DURAPORE® membrane formed of PVDF available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts. Another is a Millipore EXPRESS® hydrophilic PES membrane available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts.

The porous support 4 may be a simple screen, a grid, or a sintered porous structure such as a POREX® membrane or a coarse or large pored microporous filter, such as a non-woven paper polypropylene or polyethylene fabric or a 1-10 micron microporous filter. Such supports can be made of polymer, ceramic or metal materials including but not limited to metals, such as

stainless steel, steel a steel alloy, aluminum and the like, and polymers such as polyethylene, polypropylene, polysulfones, styrenes, nylons and the like.

Figure 3 shows an embodiment using a standard vacuum manifold 30. In this instance the manifold has porous support structure 32, such as a plastic or metal grid or a porous sintered sheet of plastic or metal or other similar devices as are well known in the vacuum art. The blotting membrane 34 is again placed on top of the support 32, covered by the flow distributor 36 and a well structure 38 as described above in relation to the embodiments of Figures 1 and 2.

Figure 4 shows a positive pressure system that may be used in the present invention. To the extent the elements are the same as those in Figures 1-3, the same reference numbers have been used.

As shown in Figure 4, the device 2A is comprised of a porous support 4. Preferably the support is formed with an edge 6 or mounting piece that is designed to fit into or onto a manifold 8. One or more layers of a blotting membrane 10 (one shown) are placed on top of the support 4. A flow distributor 12 is then placed or mounted on top of the blotting membrane 10. The flow distributor may either have one or more wells 14 (one shown in this embodiment) attached to the top surface 16 of the flow distributor 12 or it may be a separate piece (not shown) which is simply attached or placed on top of the flow distributor 12. A positive pressure manifold or cover 13 is placed over and preferably removably secured to the wells 14 and/or flow distributor 12. The positive pressure manifold 13 has a port 15 connected to a source of positive pressure via tube 17. Positive pressure may come from a pump, a pressurized gas supply (tank, canister or the like) and other such well known sources used in the lab or industry.

As shown in Figure 4, the manifold 8 is simply a collection manifold which has a port 18 that can be used to vent excess pressure. It may if desired contain an air filter to prevent the entrance of contaminants. The port 18 is located below the porous support 4. A waste collection device 22, in this instance, a receptacle, is mounted below the manifold or if desired in the manifold (not shown) to collect the liquid pulled through the device 2. Alternatively, the waste collection device can be a waste drain or other similar device as is known to one of ordinary skill in the art.

Various methods may be used in the present invention. The key factor being that they all rely on a vacuum or positive pressure driven filtration of the liquids rather than static diffusion as has occurred in the past.

The simplest method is to simply use the present invention to conduct one or more of the washing cycles. Typically each washing cycle is comprised of one or more washing steps. Generally, 2-5 steps are used per cycle.

Another method is to use the present invention in each step in which liquid needs to be removed from the blotting membrane such as after incubation of the antibodies or in the washing steps.

In all of these processes, any pressure suitable to move the liquid(s) through the device and into the manifold can be used. This can vary depending upon the membranes selected for blotting and the flow distributor, the manifold used, the desired speed of the filtration and the supply of vacuum or positive pressure available to the researcher.

Generally, the vacuum available may vary between 100 and 760mm Hg (133 millibars and 1013 millibars). The use of valves, pressure restrictors and the like may also be used to keep the vacuum within the allowed ranges for the membranes used. A preferred vacuum manifold of one embodiment of the present invention is a STERICUP® device vacuum base and the use of a vacuum of about 100 mm Hg. Other suitable vacuum manifolds include but are not limited to the MULTISCREEN™ and MULTISCREEN HTS vacuum manifolds available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts.

Generally the positive pressure is supplied by an air line at pressures ranging from about 2 psi to about 15 psi. The use of valves, pressure restrictors and the like may also be used to keep the pressure within the allowed ranges for the membranes used. Such pressure systems include but are not limited to Amicon® stirred cell devices available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts and positive pressure filtration units available from Caliper Life Sciences of Hopkinton, Massachusetts.

Typical processes are shown in Figures 5A-C in block diagram.

In Figure 5A, a device according to the invention is provided and attached to a vacuum manifold and vacuum supply 50. The blotting membrane(s) are placed into the device in the proper position 52. Preferably the blotting membrane(s) in step 52 has been prewet (not shown). The vacuum is turned on and a liquid, such as with a wash liquid, is placed into the well(s) 54. The vacuum continues until the liquid has been drawn through the device and then the vacuum is turned off 56. When more than one blotting membrane is used, they can be arranged in series on top of each other and sufficient liquid containing the same desired reagents can be easily moved

through the multiple layers in one process step. Generally when more than one layer is used it is preferred that one use between 2 and 10 layers, preferably between 2 and 5 layers at a time. Alternatively, one can use a flow distributor having multiple wells and use more than one blotting membrane in parallel to each other, each with their own well in the flow distributor and each with its own set of reagents as is required for its specific purpose. One can even use multiple layers in adjacent wells if desired.

In Figure 5B, step 54 is eliminated and the liquid is added with the vacuum off 58 and allowed to incubate, such as may be required with the primary or secondary antibodies. The vacuum is then turned on in step 60.

In Figure 55C, the steps of 55A and 55B are combined as sequential steps. Either or both steps may be repeated as needed or arranged in different sequences as desired to conduct the appropriate process.

Optionally, if one wishes, one can place a pan or single well device below the support of the membrane, preferably in the manifold itself. It can then be used to collect a single unbound reagent that may be expensive and which can be reused in future assays. Optionally, it may be subdivided into two or more subtrays.

Other processes may also be used with the device of the present invention.

Although the antibody concentrations used vary depending on the experimental design, 10 – 1,000 ng/mL is a typical range for standard method. Volumes of solution required are typically 0.1 mL/cm², 0.03 mL/cm² and 1.0 mL/cm² for blocking, antibody reactions and washing respectively.

The membrane contains, in its interstices, one or more substances to be detected. Generally these substances are present in the interstices either by virtue of having been blotted from a solid support for electrophoresis or chromatography or by direct application, usually to detect the presence, absence, or amount of a particular type of material such as an antibody or specific protein – i.e. a Dot-Blot type assay as described above. The definition of the membrane is not limited, however, to these instances, but applies to any case wherein one or more membranes contains in its interstices one or more substances to be detected. Included in the types of membranes envisioned for use in the present invention are membranes commonly used to blot electrophoresis gels such as nitrocellulose; nylon; or various other polymeric membranes, such as polyvinylidene fluoride (PVDF), sold as Immobilon™ membranes by Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts.

A variety of materials can be used to replicate the results of electrophoresis gels performed on various samples as is understood in the art. Most commonly, the samples contain biological substances such as individual proteins, antibodies, nucleic acids, oligonucleotides, complex carbohydrates, and the like, but the application of the technique is not limited to these substances. The invention technique is applicable to any membrane containing within it a substance to be detected regardless of the chemical composition of the membrane or of the target substances.

When membranes which represent replicas of electrophoretic results are employed, the transfer of the substances to be detected from the gel to the membrane can be conducted by utilizing membranes containing transfer buffer, by electroelution, electroblotting or by semi-dry blotting of the gels. Techniques for these transfers are well understood in the art, and do not constitute part of the invention herein.

The liquid to be supplied may contain detecting reagent or may simply be provided as a wash. The nature of the detecting reagent depends, of course, on the substance to be detected. Typically, proteins are detected by immunological reactions between antigen and antibody or immunoreactive portions thereof; typically the presence of nucleic acid fragments is detected by suitable oligonucleotide probes. The detecting substances responsible for the immediate or specific reaction with the substance to be detected may be further supplemented, if needed, with label and a multiplicity of applications of the detecting reagents may be needed- e.g., a protocol may include detection of an antigen by supplying an antibody labeled with an enzyme, e.g., commonly, horseradish peroxidase, and then this binding is detected by means of supplying substrate for this enzyme. In application of reagent, it is possible, though not preferred, to use only a positively pressed donor matrix to expose this component of the membrane for a defined period.

It is most convenient to conduct the method of the invention at room temperature, but elevated and lower temperatures can also be used. This can be affected by heating the device or its surrounding environment (as in a heat box or cooling box).

Blots can be sequentially analyzed with multiple antibodies or probes in the present device and process by stripping the previously bound antibodies from the blot followed by subsequent incubations with antibodies or other probes specific other target proteins. The stripping process disrupts the antigen-antibody bonds and dissolves the antibodies in the surrounding buffer. This is usually achieved by a combination of detergent and heat or by exposure to either high or low pH.

The device, in combination with the flow distributor, enables the stripping of blots using the high or low pH method. The subsequent reprobing of blots either directly (e.g., using the same flow distributor used for stripping) or subsequently after storage, would use the same protocol as the initial probing. Suitable kits for strip blotting are available from Chemicon International Inc under the brand names of ReBlot Plus kit (catalogue # 2500), Re-Blot Plus-Mild solution (catalogue # 2502) and Re-Blot Plus-Strong solution (catalogue #2504).

In standard western blotting, the antigen or target is transferred to one or more membranes support and probed with a suitable probe such as an antibody, protein (e.g., Protein A) or lectin (proteins or glycoproteins which binding to carbohydrate moieties). In some applications, a reverse format (e.g., reverse array) is used, wherein the antibody or other probes are spotted onto one or more membranes or other support (typically in an array format) and the antigen or target is presented to the immobilized antibodies on the array. Visualization of a target-probe binding event can be achieved by labeling of the antigens or targets or by using a secondary antibody specific for the target. Reverse arrays often employ mixtures of targets, for example lysates labeled with different fluorescent colors to enable parallel processing. Reverse assays can also be performed with the present invention.

EXAMPLE

The device of Figure 1 was made using the base of a STERICUP® device (available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts) as the vacuum manifold, a piece of Porex® porous plastic as the porous support, a Durapore® hydrophilic membrane (GVPP), 0.22 micron pore size as the flow distributor and a polystyrene strip (typically 4 mm larger than the membrane size. For example, 76 mm (L) X 86 mm (W) X 25 mm (H) for 72 mm X 82 mm) well formed by bending the strip at 90° to form four corners and sealing the ends of the strip to each other using (3211 light cure adhesive, available from Loctite). The well was glued to the membrane surface using the Loctite 3211 light cure adhesive.

The base was connected to a valved vacuum line via its vacuum port.

A prewet (prewet in 100% methanol, then in water) blotting membrane (IMMOBILION™ Western blotting membrane available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts) containing a sample of bovine liver lysate was placed on the base and all air bubbles between the base and membrane were removed. The flow distributor was placed on top of the blotting

membrane. All air bubbles between the base and membrane were removed. A vacuum of 100mm Hg was applied and then 10mL of a blocking solution (1% casein in TBS-T (Tris buffered saline and Tween®-20 surfactant: 20 mM Tris-CL, pH7.6, 0.8% sodium chloride, 0.1% Tween®-20 surfactant) was added to the well. The vacuum was then shut off. 1mL of a diluted rabbit anti-ERK primary antibody (diluted 1:2,000 with 1% casein in TBS-T) was added to the well and allowed to incubate for 10 minutes without any vacuum. A vacuum of 100mm Hg was applied to filter the remaining antibody liquid. 30mL of a TBS-T washing solution was added and filtered under vacuum. (until dryness). Three additional washes each, 30mL of a TBS-T washing solution, were added sequentially and filtered under vacuum. The vacuum was then turned off and 1mL of a diluted secondary antibody (alkaline phosphate conjugated goat anti-rabbit IgG antibody) (diluted 1:1,000 with 1% casein in TBS-T) was added to the well and allowed to incubate for 10 minutes without vacuum. The vacuum was then applied at 100mm Hg to filter the remaining secondary antibody solution through the flow distributor. Four sequential washes each of 30mL of a TBS-T washing solution were added and filtered under vacuum and then the vacuum was shut off. A substrate (Immobilon™ Western AP reagent) was added to the well and a detection. The membrane was exposed to an X-ray film for 1 minute and the film was processed by a film developer was completed.

A comparative example using the traditional methodology and the same type of membrane, protein (ERK) and reagents was performed in over 3 hours of time.

1. Block the membrane in 1% casein/TBS-T for 1 h (0.1 mL/cm² membrane)
2. Add Anti-ERK antibody (1:10,000 dilution with 1% casein in TBS-T) for 1 h (0.1 mL/cm² membrane)
3. Wash four times for 5 minutes in TBS-T (1.0 mL/cm² membrane)
4. Add secondary antibody (anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated at 1:5,000 dilution with 1% casein in TBS-T) for 1 h (0.1 mL/cm² membrane)
5. Wash four times for 5 minutes in TBS-T (1.0 mL/cm² membrane)
6. Add Immobilon™ Western AP reagent and incubate for 5 minutes (0.05 mL/cm² membrane)
7. Expose to X-ray film for 1 minute then proceed to film development

Figure 6 shows the comparative example and the example according to the device and process of the present invention. The Figure demonstrates the high quality detection that can be

achieved in only 30 minutes. In addition, the amount of antibodies used as compared to the traditional process was reduced by half in the process of the present invention in spite of the 5x increase in concentration in 1/10th volume of the traditional example. This not only allows researchers to do more experiments but to do so with less reagents and higher quality results. Moreover, the background noise was significantly reduced as compared to the traditional method.

Brief Description of Drawings

Figure 1 shows a first embodiment of a device according to the present invention in cross-sectional view.

Figure 2 shows a second embodiment of a device according to the present invention in cross-sectional view.

Figure 3 shows a third embodiment of a device according to the present invention in cross-sectional view.

Figure 4 shows a fourth embodiment of a device according to the present invention in cross-sectional view.

Figures 5A-5C show the embodiments of the process according to the present invention in block diagram form.

Figure 6 shows the results of an example of a blot processed according to the prior art and the current invention.

Claims

1. A device for conducting immunoassays comprising a porous support, a flow distributor placed on top of the porous support and one or more reagent wells mounted on top of the flow distributor.
2. A device for conducting vacuum assisted immunoassays comprising a vacuum manifold, a porous support, a flow distributor placed on top of the porous support and one or more reagent wells mounted on top of the flow distributor.
3. A device for conducting vacuum assisted immunoassays comprising a porous support, one or more membranes containing one or more biological entities to be assayed, the one or more membranes being mounted on top of the porous support, a flow distributor on top of the one or more membranes and one or more reagent wells mounted on top of the flow distributor.
4. A device for conducting pressure assisted immunoassays comprising a collection manifold, a porous support, one or more membranes containing one or more biological entities to be assayed, the one or more membranes being located on top of the porous support, a flow distributor placed on top of the one or more membranes, one or more reagent wells mounted on top of the flow distributor, a pressure cap removably sealed on top of the one or more reagent wells, the cap having an inlet to its interior, the inlet being connected to a source of positive gas pressure.
5. The device of claim 1 wherein the flow distributor and the one or more reagent wells are an integral unit.
6. The device of claim 1 wherein the flow distributor is a membrane and the flow distributor and one or more reagent wells are an integral unit.
7. A process for conducting vacuum assisted immunoassays comprising the steps of:
 - a. providing a vacuum manifold, a porous support placed on the vacuum manifold, one or more membranes containing one or more biological entities to be assayed, the one or more membranes being placed on the

- porous support, a flow distributor placed on top of the one or more membranes and one or more wells placed on top of the flow distributor,
- b. adding one or more reagents to the one or more wells and applying a vacuum to pull the reagents into the one or membranes, and
 - c. adding one or more washing agents to the one or more wells and applying a vacuum to pull the washing agents and any unbound reagents through the flow distributor, one or more membranes and porous support and into the vacuum manifold.
8. The process of claim 7 wherein steps (b) and (c) are repeated one or more times.
9. The process of claim 7 further comprising a step (d) of detecting the one or more biological entities.
10. The process of claim 7 further comprising a step (d) of detecting the one or more biological entities by a detection mechanism selected from the group consisting of radiological entities and colorimetric entities.
11. The process of claim 7 wherein in step (b) the reagent is an antibody and is allowed to incubate on/in the one or more blotting membranes without applying the vacuum for a set period of time.
12. A process of passing a wash or reagent-containing liquid through one or more blotting membranes containing one or more biological entities, at least one of which is to be detected wherein the process comprises:
- a. providing a vacuum manifold, a porous support placed on the vacuum manifold, a flow distributor and one or more wells placed on top of the flow distributor,
 - b. placing the one or more blotting membranes containing the one or more biological entities on the porous support,
 - c. placing the flow distributor on top of the one or more blotting membranes, adding a liquid to the well of the flow distributor, and
 - d. applying a vacuum to draw the liquid through the one or more blotting membranes.

13. A process of passing a wash or reagent-containing liquid through a blotting membrane containing one or more biological entities, at least one of which is to be detected wherein the process comprises:
- a. providing a device comprised of a collection manifold, a porous support, a flow distributor placed on top of the support, one or more wells placed on top of the flow distributor and a pressure cap removably attached to the top of the one or more wells, the cap having an inlet to its interior which inlet is connected to a supply of positive gas pressure,
 - b. placing one or more layers of blotting membrane containing the one or more biological entities on the porous support,
 - c. placing the flow distributor on top of the one or more layers of blotting membrane, adding a liquid to the one or more wells of the flow distributor, and
 - d. applying a positive pressure through the inlet to the cap to move the liquid from the wells through the one or more layers of blotting membrane and into the manifold.
14. The device of claim 1 further comprising a collection tray below the holder for the recovery of reagents.
15. The device of claim 1 further comprising a collection tray below the holder for the recovery of reagents and wherein the tray is subdivided into two or more separate subtrays.

1. Abstract

A rapid, efficient and convenient method to detect one or more biological entities on a blotting membrane is provided. The detection can relate to the position, nature or amount of the biological substance on one or more membranes. The invention method involves a pressure assisted regimen (such as vacuum or positive gas pressure) for the supply and removal of reagents and permits washing of the contaminants from substances embedded in the membrane to be detected using very low volumes of liquid. This method enables completion of the blocking, washing and antibody binding steps in about 30 minutes without comprising blot quality. In another aspect, the invention is directed to an apparatus useful in conducting the method of the invention.

The device is comprised of several layers including a porous support layer below the blotting membrane(s), a flow distributor above the blotting membrane(s) and a well on the flow distributor to contain the liquid to the desired area and to allow for lower starting volumes of such liquid. Preferably, the flow distributor is a non-binding or low binding hydrophilic porous membrane such as a 0.22 micron membrane.

2. Representative Drawing

Fig. 1

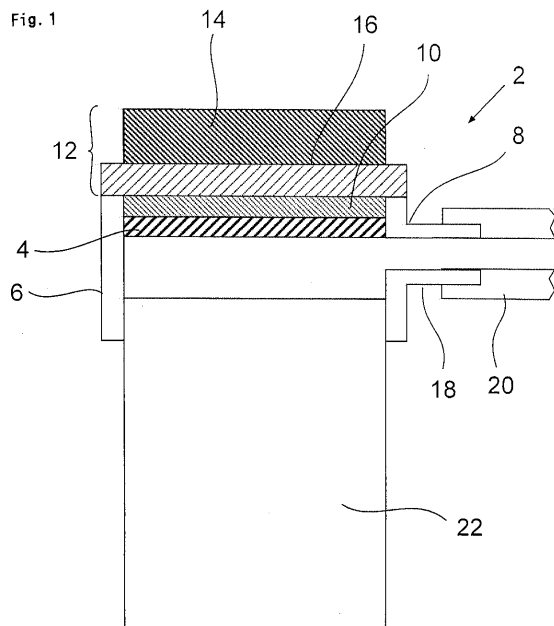


Figure 1

Fig. 2

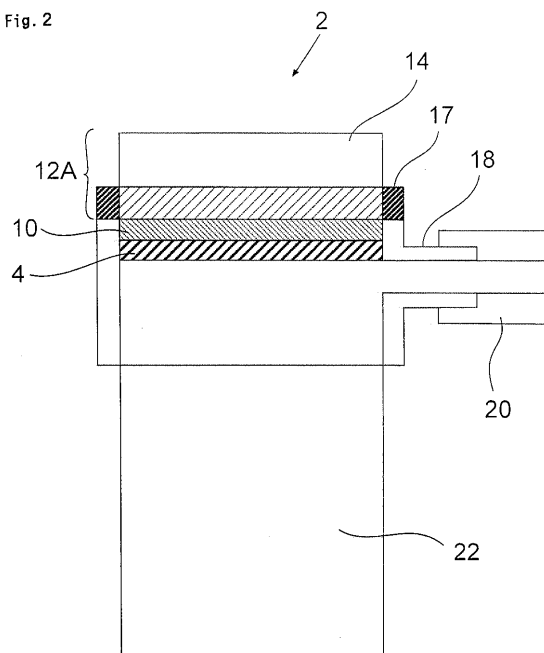


Figure 2

Fig. 3

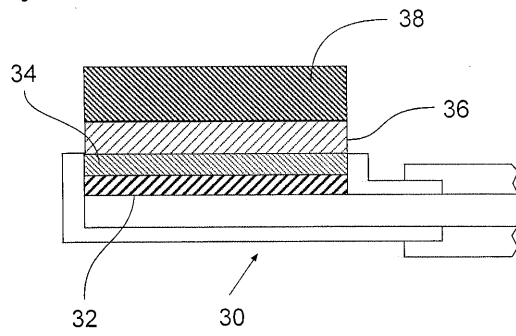


Figure 3

Fig. 4

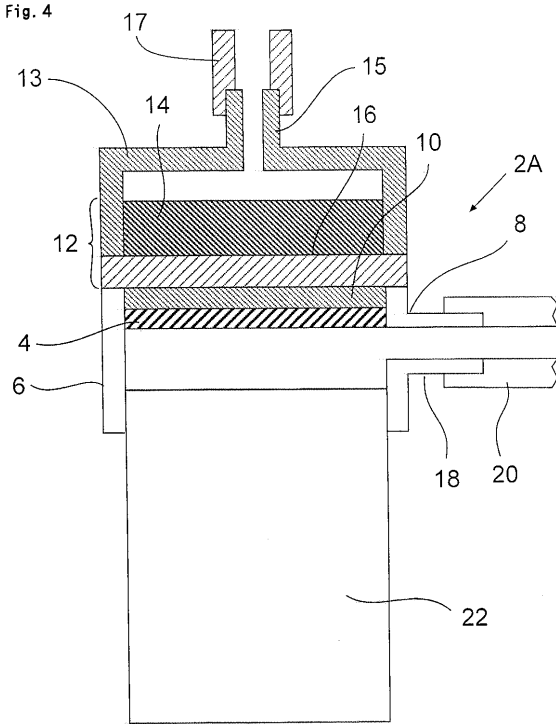


Figure 4

Fig. 5 A

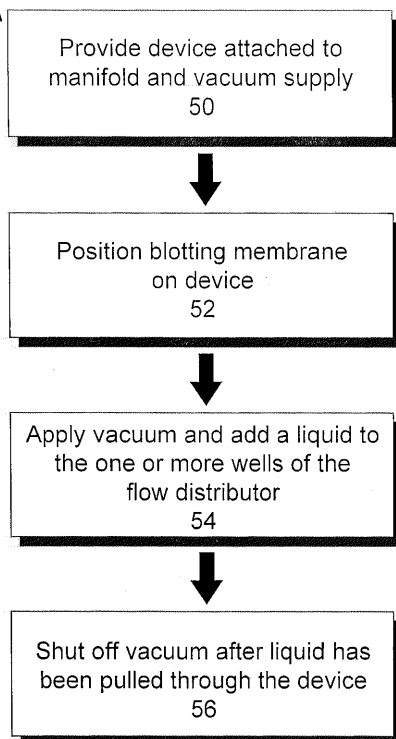


Figure 5A

Fig. 5 B

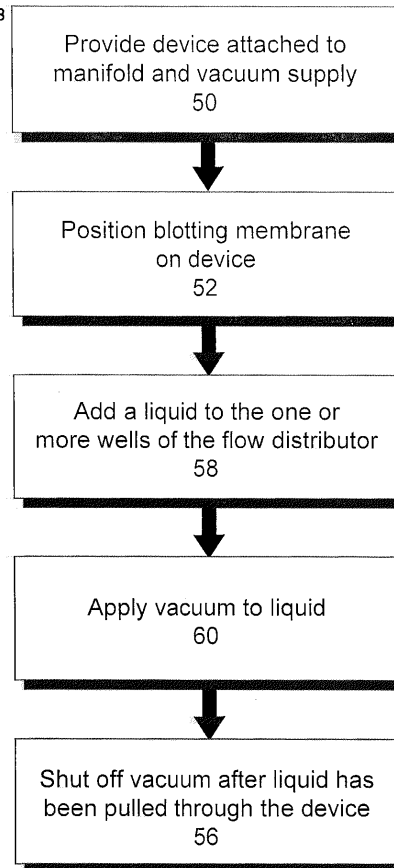


Figure 5B

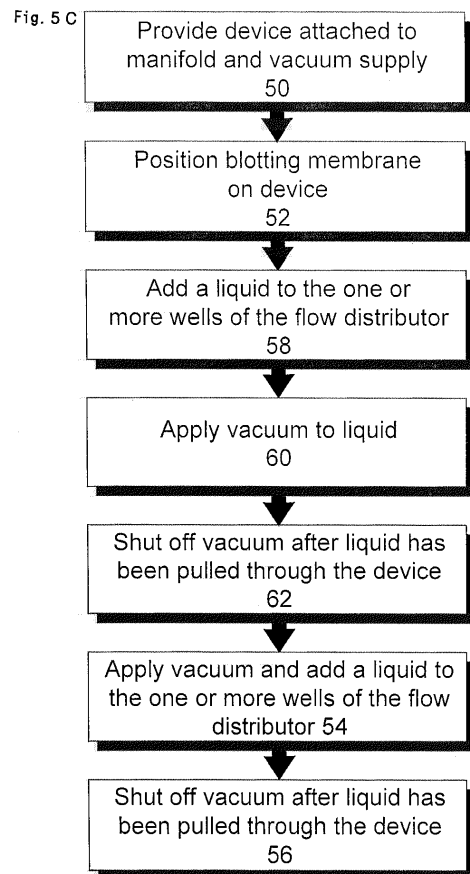
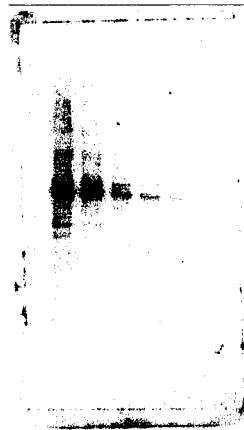
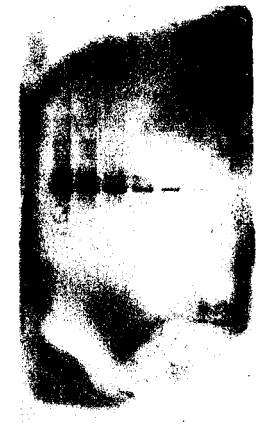


Figure 5C

Fig. 6



Example



Comparative Example

Figure 6

专利名称(译)	免疫测定的产品和工艺		
公开(公告)号	JP2007127634A	公开(公告)日	2007-05-24
申请号	JP2006292153	申请日	2006-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	EMD密理博公司		
申请(专利权)人(译)	Millipore公司		
[标]发明人	馬淵昌治 木村浩子 マークエメリック フィリップクラーク クルトグリーニゼン		
发明人	馬淵 昌治 木村 浩子 マーク・エメリック フィリップ・クラーク クルト・グリーニゼン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/447		
CPC分类号	G01N33/5302 B01L3/50255 B01L2400/0487 G01N33/54366 G01N33/54393 G01N33/561 Y10T436/2575		
FI分类号	G01N33/53.T G01N27/26.325.Z G01N27/447.325.Z		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	60/732994 2005-11-03 US 60/795452 2006-04-27 US		
其他公开文献	JP4705000B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种快速，有效和方便的方法来检测印迹膜上的一个或多个生物实体。 解决方案：关于膜上生物物质的位置，性质或数量。 本发明的方法包括压力辅助方案以供应和除去试剂，并使用非常少量的液体使污染物从被埋藏在待检测的膜中的材料中洗掉。可以在约30分钟内终止阻断，洗涤和抗体结合的步骤而不损害印迹质量。该装置包括位于印迹膜下方的多孔支撑物，位于印迹膜顶部的分流器，分流器，其将液体容纳在所需区域中并允许液体具有较低的起始体积，还有一个容器上的井。优选地，分流器是非粘合或低粘合的亲水性多孔膜，例如0.22微米的膜。 点域1

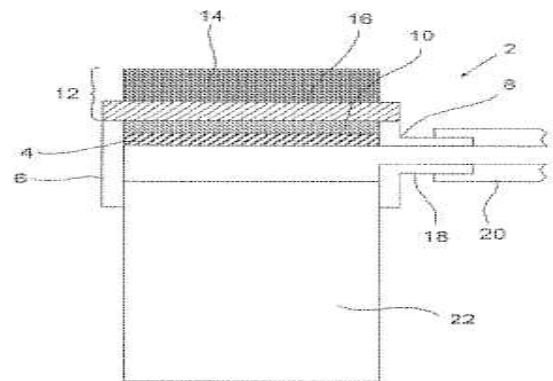


Figure 1