



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113533485 A

(43) 申请公布日 2021.10.22

(21) 申请号 202110788786.8

G01N 33/53 (2006.01)

(22) 申请日 2015.01.15

(30) 优先权数据

61/927,960 2014.01.15 US

(62) 分案原申请数据

201580004767.4 2015.01.15

(71) 申请人 卡钳生命科学股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 A·巴里 L·普罗文彻 S·科恩

I-J·陈 J·严 J·王

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陈扬扬

(51) Int. Cl.

G01N 27/447 (2006.01)

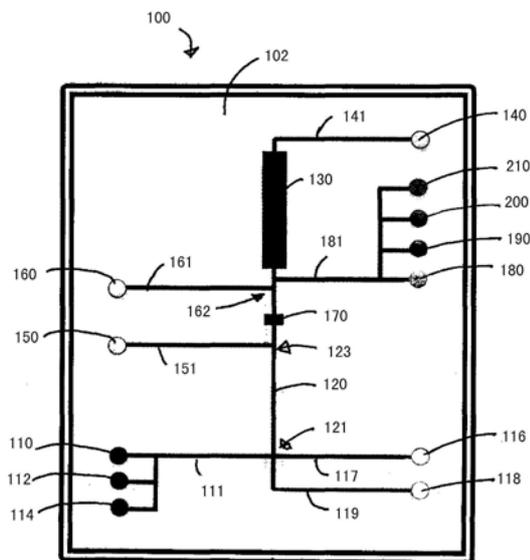
权利要求书2页 说明书8页 附图8页

(54) 发明名称

使用磁珠的微流体免疫试验的方法和系统

(57) 摘要

一种微流体Western印迹方法和系统,包括用于蛋白质的免疫试验的微流体Western印迹方法,该方法包括将包含蛋白质的样品引入至芯片(100)上;电泳分离蛋白质;将分离的蛋白质结合至珠以形成蛋白质附连的珠,该珠有磁性;使蛋白质附连的珠流入磁性保持区(130);向磁性保持区(130)施加磁场以使蛋白质附连的珠在磁性保持区(130)内固定就位;将一抗结合至与蛋白质附连的珠上的目标蛋白质;将二抗结合至结合的一抗;并且检测结合的二抗。



1. 一种用于蛋白质免疫试验的微流体Western印迹方法,所述方法包括:
将包含所述蛋白质的样品引入至芯片上;
通过施加高差分电压使所述蛋白质移动通过第一流体区;
电泳分离所述蛋白质;
将所述分离的蛋白质结合至珠,以形成蛋白质附连的珠,所述珠有磁性;
通过施加低差分电压使所述蛋白质附连的珠流入第二流体区;
向所述第二流体区施加磁场,以使所述蛋白质附连的珠在所述第二流体区内固定就位;
在所述第二流体区内将一抗结合至所述蛋白质附连的珠上的目标蛋白质;
在所述第二流体区内将二抗结合至结合的一抗;并且
检测在所述第二流体区内结合的二抗,
其中在结合一抗之前施加磁场。
2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第一流体区是分离区。
3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第二流体区是磁性保持区。
4. 如权利要求1所述的方法,还包括在引入之前用凝胶和染料预置所述芯片。
5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述将分离的蛋白质结合至珠还包括在将所述分离的蛋白质结合至珠之前使所述蛋白质脱色。
6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述电泳分离还包括检测脱色的蛋白质中的迁移峰。
7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述流动还包括使所述蛋白质附连的珠流入所述磁性保持区直至检测到所述迁移峰中的最后一个。
8. 如权利要求1所述的方法,还包括在结合一抗之前,使封闭缓冲剂在所述蛋白质附连的珠上流过所述磁性保持区。
9. 如权利要求8所述的方法,还包括孵育所述蛋白质附连的珠上的封闭缓冲剂,和,从所述磁性保持区洗去未结合的封闭缓冲剂。
10. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,结合一抗还包括孵育所述蛋白质附连的珠上的一抗,和,从所述磁性保持区洗去未结合的一抗。
11. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,结合二抗还包括从所述磁性保持区洗去未结合的二抗。
12. 如权利要求1所述的方法,还包括在所述检测之前使检测剂在所述蛋白质附连的珠上流过所述磁性保持区,所述检测还包括检测从所述检测剂与所述结合的二抗的反应发出的光。
13. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述检测包括检测具有向所述磁性保持区施加的磁场的所述磁性保持区中结合的二抗。
14. 如权利要求1所述的方法,还包括释放所述磁性保持区中的磁场,以释放所述蛋白质附连的珠。
15. 如权利要求14所述的方法,还包括使所述蛋白质附连的珠流出所述磁性保持区。
16. 如权利要求14所述的方法,其特征在于,所述检测包括检测流动通过固定检测器的结合的二抗。

17. 如权利要求14所述的方法,还包括将第二样品引入至芯片上。

18. 一种用于蛋白质免疫试验的微流体Western印迹方法,所述方法包括:

提供微流体芯片,所述微流体芯片具有限定样品孔、与所述样品孔可操作接合的分离区,和与所述分离区可操作接合的磁性保持区的基材;

将包含所述蛋白质的样品引入所述样品孔;

通过施加高差分电压使所述样品流入所述分离区;

施加贯穿分离区的电压,以电泳分离所述分离区中的蛋白质;

将所述电泳分离的蛋白质结合至珠,以形成蛋白质附连的珠,所述珠有磁性;

通过施加低差分电压使所述蛋白质附连的珠流入所述磁性保持区;

向所述磁性保持区施加磁场,以使所述蛋白质附连的珠在所述磁性保持区内固定就位;

在所述磁性保持区内将一抗结合至所述蛋白质附连的珠上的目标蛋白质;

在所述磁性保持区内将二抗结合至结合的一抗;并且

检测在所述磁性保持区内结合的二抗,

其中在结合一抗之前施加磁场。

19. 一种用于分析物的免疫试验的微流体方法,所述方法包括:

基于一种或多种分析物的尺寸和电荷,在第一流体区中解析置于所述第一流体区内的样品中的所述一种或多种分析物;

将解析的分析物结合至磁珠以形成分析物附连的珠;

在施加磁场之前,使所述分析物附连的珠流入第二流体区,其中所述第二流体区包含磁性保持区并且其中通过施加低差分电压使所述分析物附连的珠流入第二流体区;

施加磁场以使所述分析物附连的磁珠的至少一部分在所述第二流体区内固定就位;

在所述第二流体区内将检测剂结合至所述分析物附连的珠;并且

检测在所述第二流体区内的所述检测剂,

其中在结合检测剂之前施加磁场。

20. 如权利要求19所述的方法,其特征在于,所述一种或多种分析物包含蛋白质。

21. 如权利要求20所述的方法,其特征在于,解析包括电泳分离所述蛋白质。

22. 如权利要求19所述的方法,还包括将包含所述一种或多种分析物的样品引入所述第一流体区。

23. 如权利要求19所述的方法,其特征在于:

结合所述检测剂还包括将一抗结合至所述分析物附连的珠;并且将二抗结合至结合的一抗;并且

检测所述检测剂还包括检测结合的二抗。

24. 如权利要求23所述的方法,还包括使所述分析物附连的珠流至第二流体区。

25. 如权利要求19所述的方法,其特征在于:

所述珠包括一抗附连的珠;并且

结合所述检测剂还包括将二抗结合至一抗附连的珠。

使用磁珠的微流体免疫试验的方法和系统

[0001] 本申请是题为“使用磁珠的微流体免疫试验的方法和系统”的中国申请号201580004767.4的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年1月15日提交的美国临时专利申请号61/927,960的权益,其通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0004] 本发明的技术领域是试验系统,具体地,使用磁珠的微流体免疫试验的方法和系统。

[0005] 发明背景

[0006] 已经针对多种分析化学和生物化学操作提议微流体技术的应用。该技术允许在易于自动化的高通量低体积系统中进行从简单到相对复杂的化学和生物化学反应、大分子分离等。关于微流体装置和系统的其他信息描述于2003年3月18日授权Kennedy的美国专利号6,534,013,并且通过引用全文纳入。

[0007] 当用于描述流体元件,如通道、腔室或管道时,本文所用术语“微流体”或术语“微尺度”一般是指一种或多种流体通道、腔室或管道,其具有约0.1 μm 至500 μm 的至少一个内部截面尺寸,例如深度或宽度。在本发明的装置中,微孔通道优选具有约0.1 μm 至200 μm ,更优选约0.1 μm 至100 μm ,并且通常约0.1 μm 至20 μm 的至少一个截面尺寸。

[0008] 通常,微流体系统包括微流体装置或芯片,其具有集成的亚微米通道的网络,物质在其中被运输、混合、分离并检测。微流体系统通常也含有向芯片提供流体驱动力并检测芯片发出的信号的组件。

[0009] 可从多种不同材料,包括玻璃或聚合物材料制造微流体芯片。市售的微流体芯片的示例是由马萨诸塞州霍普金顿的卡尺生命科学公司(Caliper Life Sciences, Inc.)制造的DNA LabChip[®],其与由加利福尼亚帕罗奥图安捷伦科技有限公司(Agilent Technologies, Inc.)制造的Agilent 2100 Bioanalyzer系统联用。该芯片有2个主要组件:玻璃制成的工作部分,和与该工作部分结合的塑料盒(caddy)或安装件(mount)。工作部分在其内部含有微流体通道,并且在其外部含有向微流体通道提供入口的孔。一般通过将2个或更多个平面基片层结合在一起制造工作部分。当一个平面基片包封在另一个平面基片上形成的凹槽时在工作部分中形成微流体通道。安装件保护芯片的工作部分,并且让使用者更易于操作该芯片。增加的操作容易性部分由以下事实导致:安装件比装置的工作部分大,其在许多情况中太小且太薄以无法容易地操作。可从任意合适的聚合物材料,如丙烯酸类或热塑性材料制造安装件。一般使用紫外固化粘合剂来将玻璃工作部分结合至聚合物安装件。安装件中的储器向芯片的工作部分上的孔提供了入口。储器容纳比工作部分中的孔大得多的材料体积,由此在使用者的宏观环境和微流体装置的孔和通道的微环境之间提供接口。

[0010] 这种微流体芯片类型是“平面”芯片。在平面芯片中,该芯片中微通道的唯一入口

是通过盒中的储器并且进而通过工作部分中的孔。另一个微流体芯片类型是“吸管”芯片，其具有从芯片延伸的小管或毛细管（“吸管”），芯片外储存的流体通过其被导入芯片中的微流体通道。典型的吸管芯片具有1至12个吸管。使用中，将吸管置于具有样品材料的容器中，并且微量的样品材料通过毛细管引入或“吸入”芯片的微流体通道中。可重复该吸入过程以将任意数量的不同样品材料引入芯片中。吸管使得更易于在单个微流体芯片上对多种样品进行高通量分析。

[0011] 已经开发了Western印迹电泳试验来检测样品中的特定蛋白质。可将该过程分成3个部分：蛋白质分离、样品转移和免疫试验。在蛋白质分离中，将机械和/或化学技术应用于样品，如组织样品，以暴露蛋白质。然后用凝胶电泳分离蛋白质，其中不同蛋白质在差分电压下通过凝胶的移动速度由单个蛋白质的分子量所控制。在样品转移中，分离的蛋白质在称为电印迹的过程中从凝胶内移动到膜上，其使用电流来移动蛋白质。在免疫试验中，一抗附连至膜上的目标蛋白质，二抗附连至一抗，并且发光体与二抗反应以在各目标蛋白质处产生光。光的检测提供了对目标蛋白质的鉴定和定量。

[0012] 虽然现有Western印迹电泳方法提供了有价值的结果，但该现有方法存在多个问题。现有方法是耗费劳动的过程，其手动进行并且需要凝胶平板和特定膜纸来转移分离的蛋白质。该过程的手动性质增加了成本并且限制了可测试的样品数量。典型的Western分析需要8-24小时的监视操作，几乎一半需要亲自手动操作。

[0013] 需要克服上述缺陷的使用磁珠的微流体免疫试验的方法和系统。

发明内容

[0014] 本发明的一个方面提供了用于蛋白质免疫试验的微流体Western印迹方法，该方法包括将包含蛋白质的样品引入至芯片上；电泳分离蛋白质；将分离的蛋白质结合至珠以形成蛋白质附连的珠，该珠有磁性；使蛋白质附连的珠流入磁性保持区；向磁性保持区施加磁场以使蛋白质附连的珠在磁性保持区内固定就位；将一抗结合至蛋白质附连的珠上的目标蛋白质；将二抗结合至结合的一抗；并且检测结合的二抗。

[0015] 本发明的另一个方面提供了用于蛋白质免疫试验的微流体Western印迹方法，该方法包括提供具有有限样品孔、与样品孔可操作接合(couple)的分离区，和与分离区可操作接合的磁性保持区的基材的微流体芯片；向样品孔中引入包含蛋白质的样品；使样品流入分离区；施加跨越分离区的电压以电泳分离分离区中的蛋白质；将电泳分离的蛋白质结合至珠以形成蛋白质附连的珠，该珠是有磁性的；使蛋白质附连的珠流入磁性保持区；向磁性保持区施加磁场以使蛋白质附连的珠在磁性保持区内固定就位；将一抗结合至蛋白质附连的珠上的目标蛋白质；将二抗结合至结合的一抗；并且检测结合的二抗。

[0016] 本发明的另一个方面提供了使用珠的蛋白质免疫试验的微流体Western印迹系统，该系统包括具有有限样品孔、与样品孔可操作接合的分离区，和与分离区可操作接合的磁性保持区的基材的微流体芯片；以及可操作连接以向磁性保持区提供磁场的电磁体，可操作该磁场以使珠在磁性保持区内固定就位。

[0017] 本发明的另一个方面提供了用于分析物免疫试验的微流体方法，该方法包括基于一种或多种分析物的尺寸和电荷在第一流体区中解析置于第一流体区内的样品中的这一种或多种分析物；将解析的分析物结合至磁珠以形成分析物附连的珠；施加磁场以使分析

物附连的珠的至少一部分固定就位;将检测剂结合至分析物附连的珠;并且检测所述检测剂。

[0018] 结合附图,通过以下关于优选实施方式的描述,可以清楚地了解本发明的上述和其它的特征和优点。详细说明和附图仅仅是示例性而非限制性的,本发明的范围由所附权利要求书及其等同项所限定。

[0019] 附图的简要说明

[0020] 图1是按照本发明制成的具有多个样品孔、分开的脱色孔和珠孔,以及检测剂孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。

[0021] 图2是按照本发明制成的具有合并的脱色和珠孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。

[0022] 图3是按照本发明制成的具有多个样品孔以及合并的脱色和珠孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。

[0023] 图4是按照本发明制成的具有多个样品孔以及分开的脱色和珠孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。

[0024] 图5是按照本发明制成的具有多个样品孔、合并的脱色和珠孔,以及检测剂孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。

[0025] 图6是按照本发明制成的具有样品吸管的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。

[0026] 图7是按照本发明制成的具有抗体吸管的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。

[0027] 图8是本发明的微流体Western印迹方法的流程图。

[0028] 相似的元件在各图之间有相似的附图标记。

[0029] 发明详述

[0030] 图1是按照本发明制成的具有多个样品孔、分开的脱色孔和珠孔,以及检测剂孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。

[0031] 微流体芯片100具有限定用于进行免疫试验的Western印迹方法的多个孔和通道的基材102。在该实施方式中,基材102限定样品孔110、与样品孔110可操作接合的分离区120,和与分离区120可操作接合的磁性保持区130。

[0032] 样品孔110可通过样品通道111连接至分离区120。样品孔110也可通过穿过样品通道111的注射通道117可操作地连接至注射电极116。操作中,包括蛋白质的样品可通过在样品孔110和注射电极116之间施加差分电压通过样品通道111从样品孔110流入注射通道117。注射通道117可操作地连接至第一分离电极通道119。样品可通过在注射电极116和可操作地连接至第一分离电极通道119的第一分离电极118之间施加差分电压从注射通道117流至第一分离电极通道119。在一个实施方式中,用于使蛋白质在芯片周围移动的差分电压可以是高差分电压,这与可用于使免疫试验化学物移动通过磁性保持区的低差分电压相反。

[0033] 在该示例中,微流体芯片100包括多个样品孔110、112、114。可依次处理来自样品孔的样品,即,可首先处理来自样品孔110的样品,之后是来自样品孔112和样品孔114的样品。本领域技术人员将理解微流体芯片100可根据特定应用的需要包括任意数量的样品孔。

[0034] 第一分离电极通道119可操作地连接至分离区120。用凝胶和染料探测分离区120，从而可在分离区120中的样品上进行电泳。分离区120也可通过磁性保持区130和第二分离电极通道141连接至第二分离电极140。

[0035] 可通过在第一分离电极118和第二分离电极140之间施加差分电压在样品上进行电泳。由于低分子量蛋白质会比高分子量蛋白质更快地移动通过下游末端121和上游末端123之间的分离区120的凝胶，电泳将样品中的蛋白质会分成一个或多个蛋白质峰。也可利用第一分离电极118和第二分离电极140之间的差分电压来将样品从分离区120移至磁性保持区130。

[0036] 脱色孔150可通过脱色通道151可操作地连接至分离区120的下游末端123，以向离开分离区120的分离的样品添加脱色溶液。脱色溶液去除洗涤剂(SDS)胶束，从而允许观察样品中的蛋白质峰并降低信号背景。可通过在与脱色孔150相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来使脱色溶液流入样品。

[0037] 可在分离区120和磁性保持区130之间提供峰检测区170。监测峰检测区170的峰光学检测器(未显示)可检测移动通过峰检测区170的样品中的蛋白质峰，其可用于检测最后的蛋白质峰何时进入磁性保持区130。

[0038] 珠孔160可通过珠通道161可操作地连接至峰检测区170的下游末端以向离开峰检测区170的分离的样品添加珠。珠表面经官能化以附连至样品中的任意和全部蛋白质以形成蛋白质附连的珠。此外，珠有磁性并且可在磁性保持区130内通过磁性方式被操作。在一个实施方式中，珠可以是一抗附连的珠，即，在制造时并且在将珠引入至芯片上之前带有附连至珠的一抗的珠。示例性的珠购自德国巴斯韦勒的珀金埃尔默chemagen技术公司(PerkinElmer chemagen Technologie GmbH)。在一个实施方式中，珠可以是纳米珠。可通过在与珠孔160相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来使珠流入样品。

[0039] 免疫试验通道181可附连珠通道161的下游并且在磁性保持区130之前以允许添加免疫化学物。在该示例中，免疫试验通道181可操作地连接至封闭缓冲剂孔180、一抗孔190、二抗孔200，和检测剂孔210。当使用第一分离电极118和第二分离电极140之间的差分电压来将样品移入磁性保持区130时，可在加入免疫试验化学物之前关闭差分电压。

[0040] 在操作中，当最后的蛋白质峰进入磁性保持区130时，可关闭第一分离电极118和第二分离电极140之间的差分电压，并且可使可操作地连接至磁性保持区130的电磁体(未显示)通电，以使蛋白质附连的珠在磁性保持区130内固定就位。在一个示例中，通过环状电磁体来产生磁场，所述环状电磁体将蛋白质附连的珠维持分散贯穿磁性保持区130内的毛细管部分。

[0041] 各自来自封闭缓冲剂孔180、一抗孔190、二抗孔200，和检测剂孔210的免疫试验化学物可通过在与各孔相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来流过磁性保持区130，进而接触蛋白质附连的珠。在按照具体应用的需要施加各免疫试验化学物之间可通过在与脱色孔150相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来洗涤磁性保持区130。在免疫试验化学物之一已经流入磁性保持区130之后，可通过去除在与各孔相关的电极和第二分离电极140之间的差分电压允许各免疫试验化学物在磁性保持区130内孵育以提供具体应用所需的孵育时间和/或温度。

[0042] 可通过在与封闭缓冲剂孔180相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压

来使封闭缓冲剂流入磁性保持区130。在蛋白质结合至珠之后使用封闭缓冲剂以使珠的所有剩余蛋白质结合位点饱和并且防止非特异性免疫试验试剂结合至珠。本领域技术人员将理解可按照具体应用的需要在不使用封闭缓冲剂的情况下进行免疫试验。可通过在与脱色孔150相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来从磁性保持区130中洗去任意未结合的封闭缓冲剂。

[0043] 可通过在与一抗孔190相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来使一抗流入磁性保持区130。一抗与蛋白质附连的珠上的目标蛋白质结合。可通过在与脱色孔150相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来从磁性保持区130中洗去任意未结合的一抗。在一个示例中,微流体芯片100包括可操作地连接至磁性保持区130的加热元件(未显示)以在具体应用所需的温度下在蛋白质附连的珠上孵育一抗。

[0044] 可通过在与二抗孔200相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来使二抗流入磁性保持区130。二抗与结合至蛋白质附连的珠的一抗结合。可通过在与脱色孔150相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来从磁性保持区130中洗去任意未结合的二抗。

[0045] 可通过在与检测剂孔10相关的电极和第二分离电极140之间施加差分电压来使检测剂流入磁性保持区130。检测剂与结合至一抗的二抗发生反应,一抗结合至目标蛋白质。在一个示例中,二抗包括偶联的酶(例如,辣根过氧化物酶HRP)并且检测剂是与偶联的酶发生反应并生成光的酶底物(例如,辣根过氧化物酶酪酰胺信号放大HRP/TSA)。

[0046] 可使用免疫试验光学检测器(未显示)来检测来自二抗的光。在一个实施方式中,当蛋白质附连的珠在磁性保持区130内固定就位时,可操作地连接免疫试验光学检测器来接收来自磁性保持区130的光。可在测量光之后释放磁性保持区130中的磁场并且可从微流体芯片100中去除样品。在另一个实施方式中,因为蛋白质附连的珠流过已被释放的磁性保持区130中的磁场中的免疫试验光学检测器,并且在第一分离电极118和第二分离电极140之间已经施加差分电压,免疫试验光学检测器经可操作地连接以接收来自蛋白质附连的珠的光。

[0047] 废料孔可与第二分离电极140相关,使得可通过在第一分离电极118和第二分离电极140之间施加差分电压来从微流体芯片100中去除样品。在一个实施方式中,另一样品,如来自第二样品孔112的样品,可在从芯片中去除第一样品之后被测试。在另一个实施方式中,另一样品,如来自第二样品孔112的样品,可在从芯片中去除第一样品的同时移入分离区120。

[0048] 本领域技术人员将理解微流体芯片100可适应具体应用的需要。在一个实施方式中,分离区120、峰检测区170,和/或磁性保持区130中的一个或多个是通道。在另一个实施方式中,分离区120、峰检测区170,和/或磁性保持区130中的一个或多个是腔室。使样品移动通过微流体芯片100的驱动力可以是沿着通道的差分电压和/或差分压力。微流体芯片100可应用于进行其他类型的免疫试验。

[0049] 也可根据具体应用的需要选择免疫试验化学物。在一个实施方式中,一抗与单一目标蛋白质结合并且免疫试验光学检测器接收单一波长的光以鉴定并定量单一目标蛋白质。在另一个实施方式中,可在单个芯片上进行多重化,其中一抗是与不同目标蛋白质结合并且与不同二抗结合的抗体的混合物。不同二抗可生成不同波长的光,使得在免疫试验光

学检测器上接收来自磁性保持区的光时可同时鉴定并定量超过一种目标蛋白质。

[0050] 图2-7显示不同微流体Western印迹装置的元件的各种组合。本领域技术人员将理解可根据具体应用的需要提供不同组合的各种元件。

[0051] 图2是按照本发明制成的具有合并的脱色和珠孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。在该实施方式中,微流体芯片300具有基材302,其形成通过脱色/珠通道351可操作地连接至分离区120的下游末端123的脱色/珠孔350,以向离开分离区120的分离的样品中添加脱色溶液和珠的混合物。可使用脱色溶液和珠的混合物从磁性保持区中洗涤免疫试验化学物(封闭缓冲剂、一抗、二抗)。该实施方式包括单个样品孔110而不是多个样品孔并且省略了与免疫试验通道181连接的检测剂孔。

[0052] 图3是按照本发明制成的具有多个样品孔以及合并的脱色和珠孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。在该实施方式中,微流体芯片400具有基材402,其形成通过脱色/珠通道351可操作地连接至分离区120的下游末端123的脱色/珠孔350以向离开分离区120的分离的样品中添加脱色溶液和珠的混合物。该实施方式包括多个样品孔110、112、114并且省略了与免疫试验通道181连接的检测剂孔。

[0053] 图4是按照本发明制成的具有多个样品孔以及分开的脱色和珠孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。在该实施方式中,微流体芯片500具有基材502,其形成多个样品孔110、112、114。该实施方式包括分开的脱色孔150和珠孔160,以使峰检测区170中的珠和用于洗涤免疫试验化学物(封闭缓冲剂、一抗、二抗)的脱色溶液中的珠避开磁性保持区。该实施方式也省略了与免疫试验通道181连接的检测剂孔。

[0054] 图5是按照本发明制成的具有多个样品孔、合并的脱色和珠孔、以及检测剂孔的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。在该实施方式中,微流体芯片600具有基材602,其形成多个样品孔110、112、114。该实施方式包括通过脱色/珠通道351可操作地连接至分离区120的下游末端123的脱色/珠孔350,以向离开分离区120的分离的样品中添加脱色溶液和珠的混合物。该实施方式也包括与免疫试验通道181可操作地连接的检测剂孔10。

[0055] 图6是按照本发明制成的具有样品吸管的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。在该实施方式中,微流体芯片700具有基材702,其形成通过低压端口通道711可操作地连接至样品通道111的低压端口710和通过吸管端口通道721可操作地连接至样品通道111的吸管端口720。在操作中,低压端口710保持在比吸管端口720低的压力下,其已经引入孔板(未显示)如96孔板等的样品孔。孔板中含有的样品通过吸管端口720抽入样品通道111。在该示例中,来自孔板的多个样品可通过微流体芯片700利用来自封闭缓冲剂孔180、一抗孔190,和二抗孔200的相同免疫试验化学物处理。

[0056] 图7是按照本发明制成的具有抗体吸管的微流体Western印迹装置的一个实施方式的俯视图。在该实施方式中,微流体芯片800具有基材802,其形成通过低压端口通道811可操作地连接至免疫试验通道181的低压端口810和通过吸管端口通道821可操作地连接至免疫试验通道181的吸管端口820。在操作中,低压端口810保持在比吸管端口820低的压力下,其已经引入孔板(未显示)如96孔板等的抗体孔。孔板中含有的抗体通过吸管端口820抽入免疫试验通道181。在该示例中,来自孔板的多种抗体可通过微流体芯片800利用来自样品孔110的相同样品处理。

[0057] 图8是本发明的微流体Western印迹方法的流程图。用于蛋白质的免疫试验的微流体Western印迹方法900包括将包含蛋白质的样品引入至芯片上910;电泳分离蛋白质920;将分离的蛋白质结合至珠以形成蛋白质附连的珠930,该珠有磁性;使蛋白质附连的珠流入磁性保持区940;向该磁性保持区施加磁场以使蛋白质附连的珠在磁性保持区内固定就位950;将一抗结合至蛋白质附连的珠上的目标蛋白质960;将二抗结合至结合的一抗970;并且检测结合的二抗980。可使用如图1-7所示具有限定样品孔、与样品孔可操作地接合的分离区,和与分离区可操作地接合的磁性保持区的基材的微流体芯片来进行方法900。

[0058] 参考图8,将包含蛋白质的样品910引入至芯片上将样品移入位置以进行Western印迹方法。在一个实施方式中,可通过在芯片上的电极之间施加差分电压来加载样品。在另一个实施方式中,可通过在芯片上的端口之间施加差分压力来加载样品。本领域技术人员将理解可以具体应用所需的任意方式加载样品。在一个实施方式中,方法900可包括在引入910之前用凝胶和染料预置(priming)芯片。

[0059] 由于较低分子量的蛋白质比高分子量的蛋白质更快地移动通过芯片上分离区的凝胶,电泳分离蛋白质920可包括施加差分电压以将样品中的蛋白质分成一个或多个蛋白质峰。

[0060] 将分离的蛋白质结合至珠以形成蛋白质附连的珠930基本将样品中所有分离的蛋白质附连至珠。该珠有磁性,使得可通过磁场来移动蛋白质附连的珠。在一个实施方式中,将分离的蛋白质结合至珠930可包括在将分离的蛋白质结合至珠之前使蛋白质脱色。电泳分离蛋白质920然后还可包括检测脱色的蛋白质中的迁移峰。使蛋白质附连的珠流入磁性保持区940然后还包括使蛋白质附连的珠流入磁性保持区直至检测到迁移峰中的至少一个,此时所有的蛋白质附连的珠将在磁性保持区中。

[0061] 使蛋白质附连的珠流入磁性保持区940将蛋白质附连的珠置于磁性保持区中的位置上,用于免疫试验。在一个实施方式中,可通过在芯片上的电极之间施加差分电压来使蛋白质附连的珠流动。在另一个实施方式中,可通过在芯片上的端口之间施加差分压力来使蛋白质附连的珠流动。本领域技术人员将理解可使蛋白质附连的珠以具体应用所需的任何方式流入磁性保持区。

[0062] 向磁性保持区施加磁场950以使蛋白质附连的珠在磁性保持区内固定就位使蛋白质附连的珠在免疫试验期间保持就位。在一个示例中,来自电磁体的磁场可将蛋白质附连的珠保持在磁性保持区的基部。磁场也可保持磁性保持区内样品的蛋白质峰的相对位置。

[0063] 将一抗结合至蛋白质附连的珠上的目标蛋白质960对用于检测的目标蛋白质加标记,而不对不感兴趣的其余蛋白质加标记。在一个实施方式中,将一抗结合至目标蛋白质960可包括孵育蛋白质附连的珠上的一抗并且从磁性保持区洗去未结合的一抗。在另一个实施方式中,方法900可包括在结合一抗之前,使封闭缓冲剂在蛋白质附连的珠上流过磁性保持区。方法900然后还可包括孵育蛋白质附连的珠上的封闭缓冲剂并且从磁性保持区洗去未结合的封闭缓冲剂。

[0064] 将二抗结合至结合的一抗970用二抗对结合的一抗加标记,该二抗用于鉴定附连至目标蛋白质的结合的一抗。在一个实施方式中,将二抗结合至结合的一抗970可包括从磁性保持区洗去未结合的二抗。

[0065] 检测结合的二抗980可提供对样品中目标蛋白质的指示,这是由于结合的二抗附

连至结合的一抗,结合的一抗附连至目标蛋白质。在一个实施方式中,方法900包括在检测980之前使检测剂在蛋白质附连的珠上流过磁性保持区,并且,检测结合的二抗980包括检测从检测剂与结合的二抗的反应发出的光。

[0066] 可用磁性保持区中的样品或在样品从磁性保持区流出时进行对结合的二抗的检测980。在一个实施方式中,检测980可包括检测具有向磁性保持区施加的磁场的磁性保持区中结合的二抗。在另一个实施方式中,方法900可包括释放磁性保持区中的磁场以释放蛋白质附连的珠。检测980然后可包括检测流动通过固定检测器的结合的二抗。

[0067] 方法900可通过排空磁性保持区和/或引入用于分析的新样品来持续。在一个实施方式中,方法900可包括释放磁性保持区中的磁场以释放蛋白质附连的珠。方法900还可包括将第二样品引入至芯片上并且根据需要在第二样品上进行Western印迹分析。在一个实施方式中,可在从芯片上去除第一样品之后测试第二样品。在另一个实施方式中,可在从芯片上去除第一样品的同时电泳分离第二样品。可在顺序样品之间提供芯片的洗涤以根据具体应用所需防止交叉污染。

[0068] 重要的是,应注意图1-8显示本发明的具体应用和实施方式,并且不旨在显示本发明或本文所述的权利要求的范围。在阅读说明书并且看过其附图之后,各种本发明的其他实施方式对本领域技术人员而言将变得显而易见,并且这些实施方式被考虑并且落在本发明的范围内。上述实施例主要涉及使用纳米珠的在芯片上的蛋白质Western印迹免疫试验,但是本领域技术人员将理解使用磁珠的微流体免疫试验的方法和系统可同等应用于使用磁珠的芯片上任意分析物的免疫试验。

[0069] 虽然本文所述的本发明实施方式目前认为是优选的,但可进行各种变化和修改而不背离本发明的精神和范围。本发明的范围由所附权利要求书限定,在等同形式的含义和范围内的所有变化包括在本发明范围内。

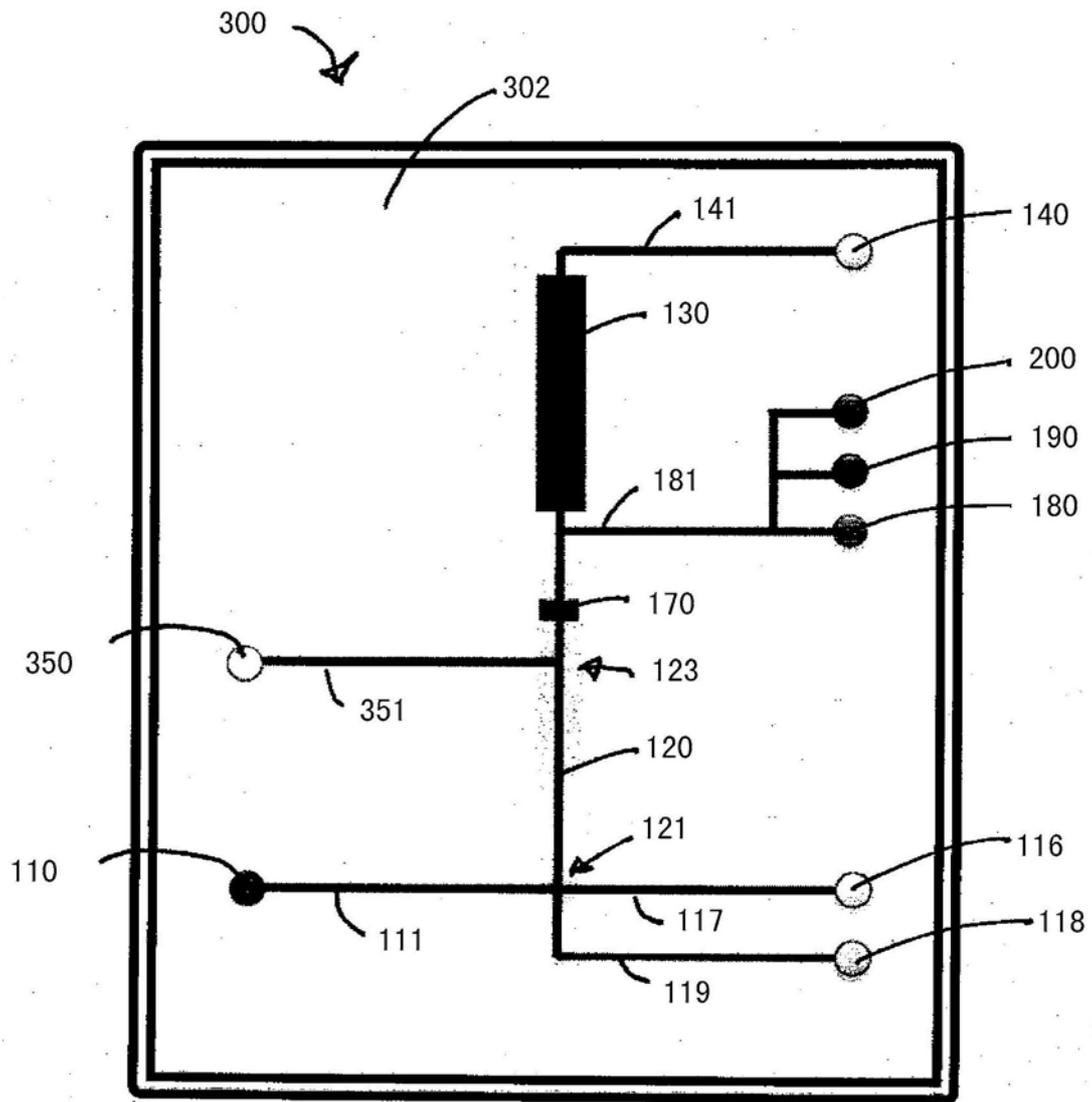


图2

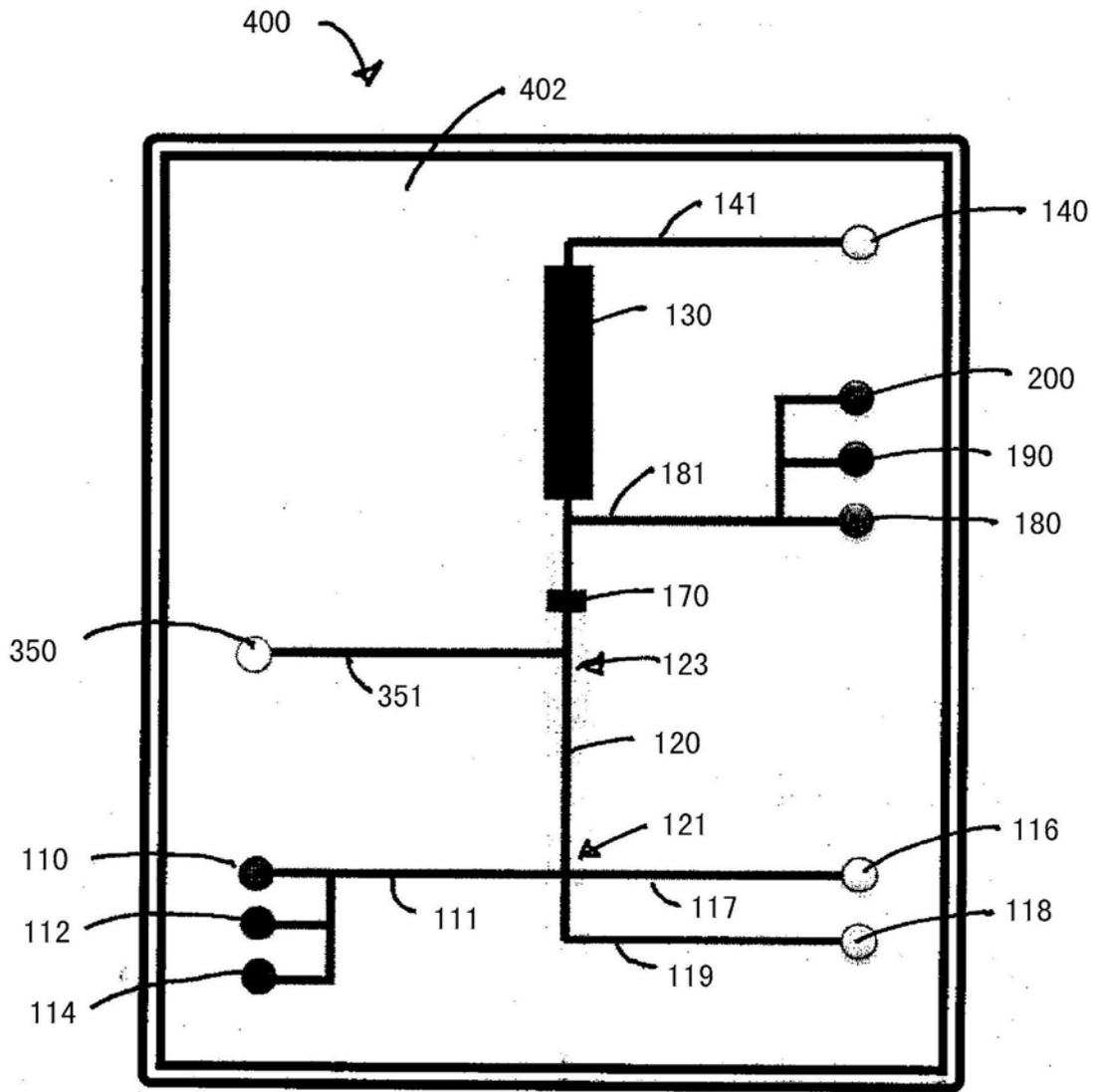


图3

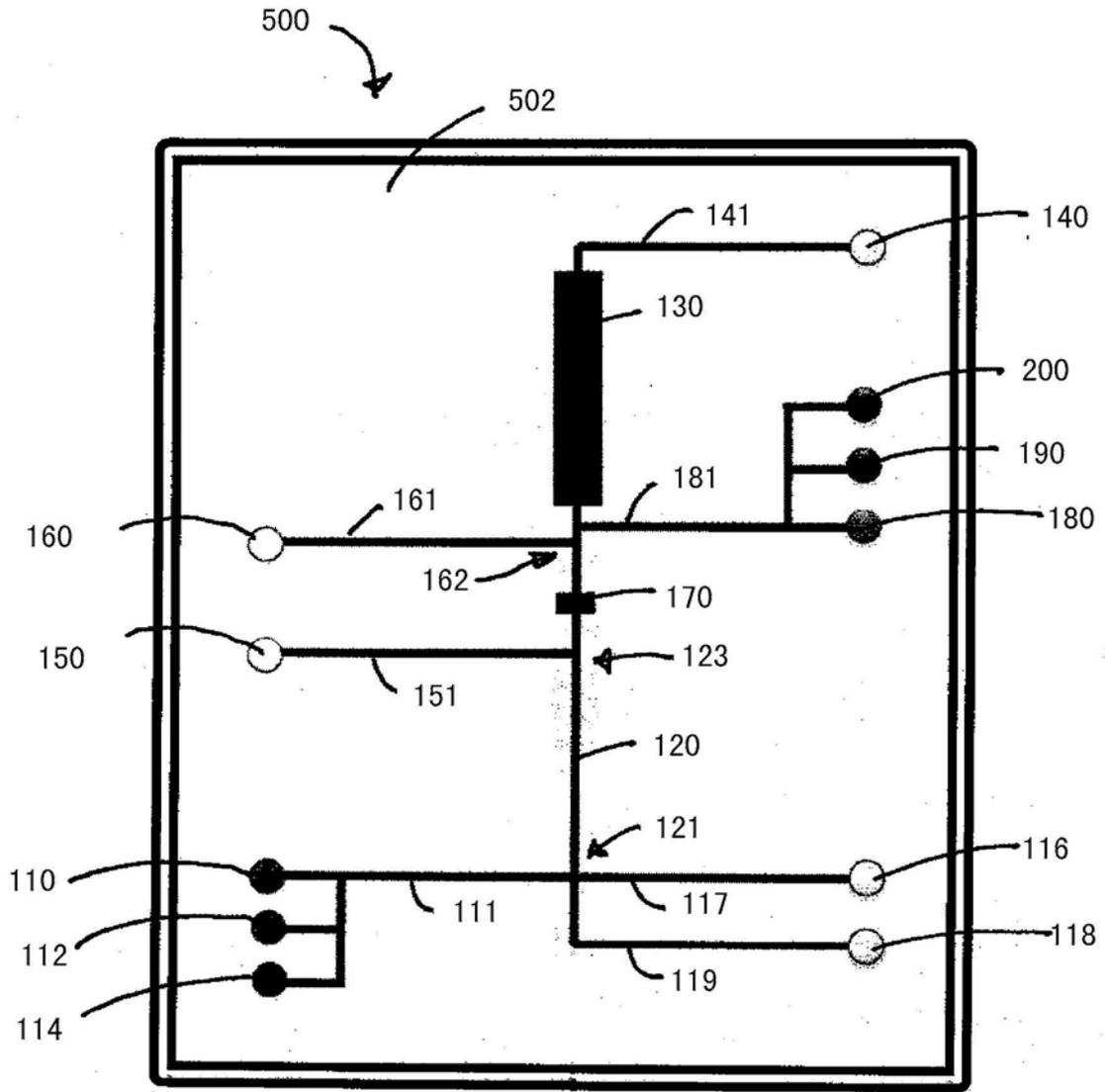


图4

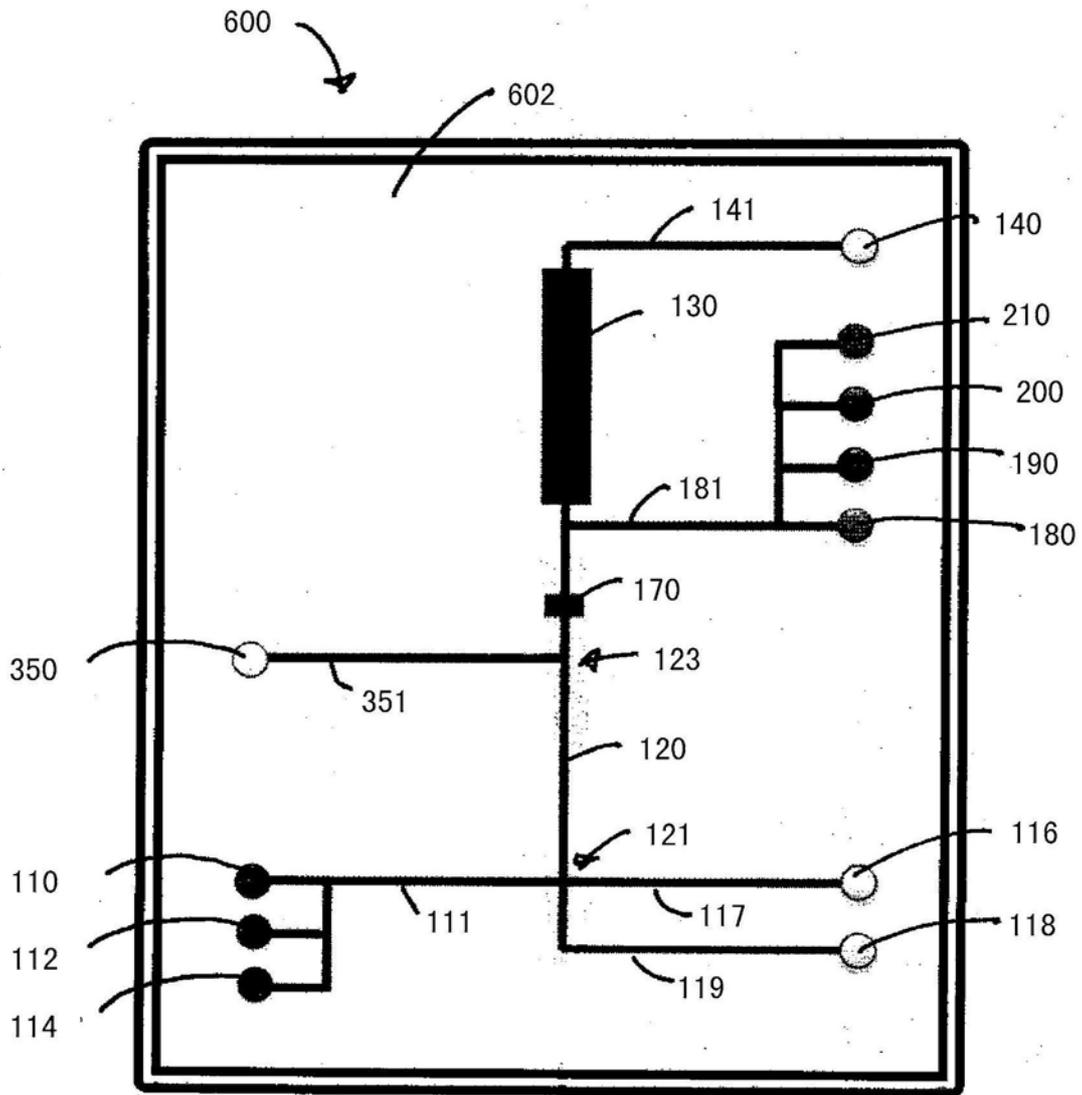


图5

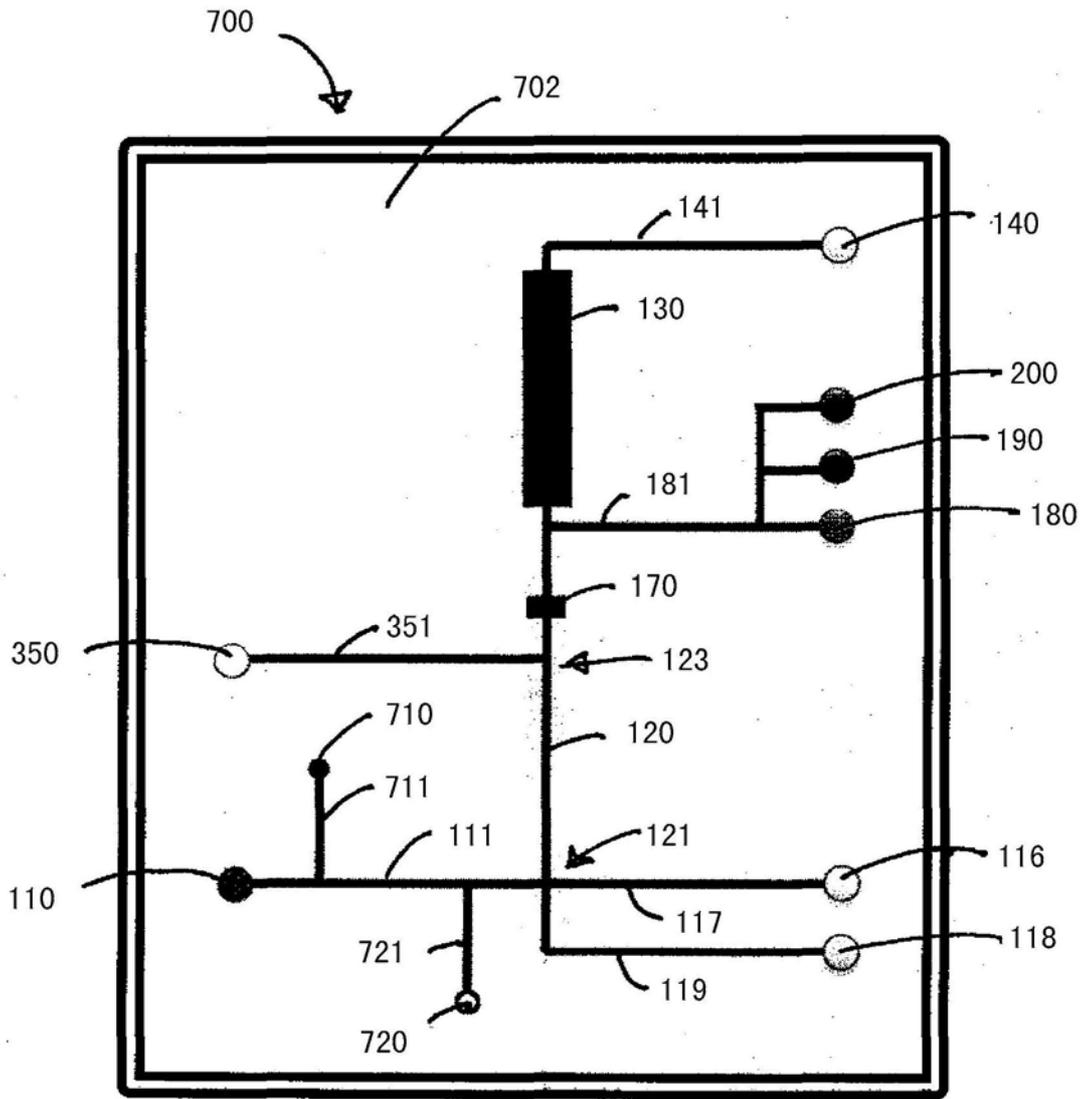


图6

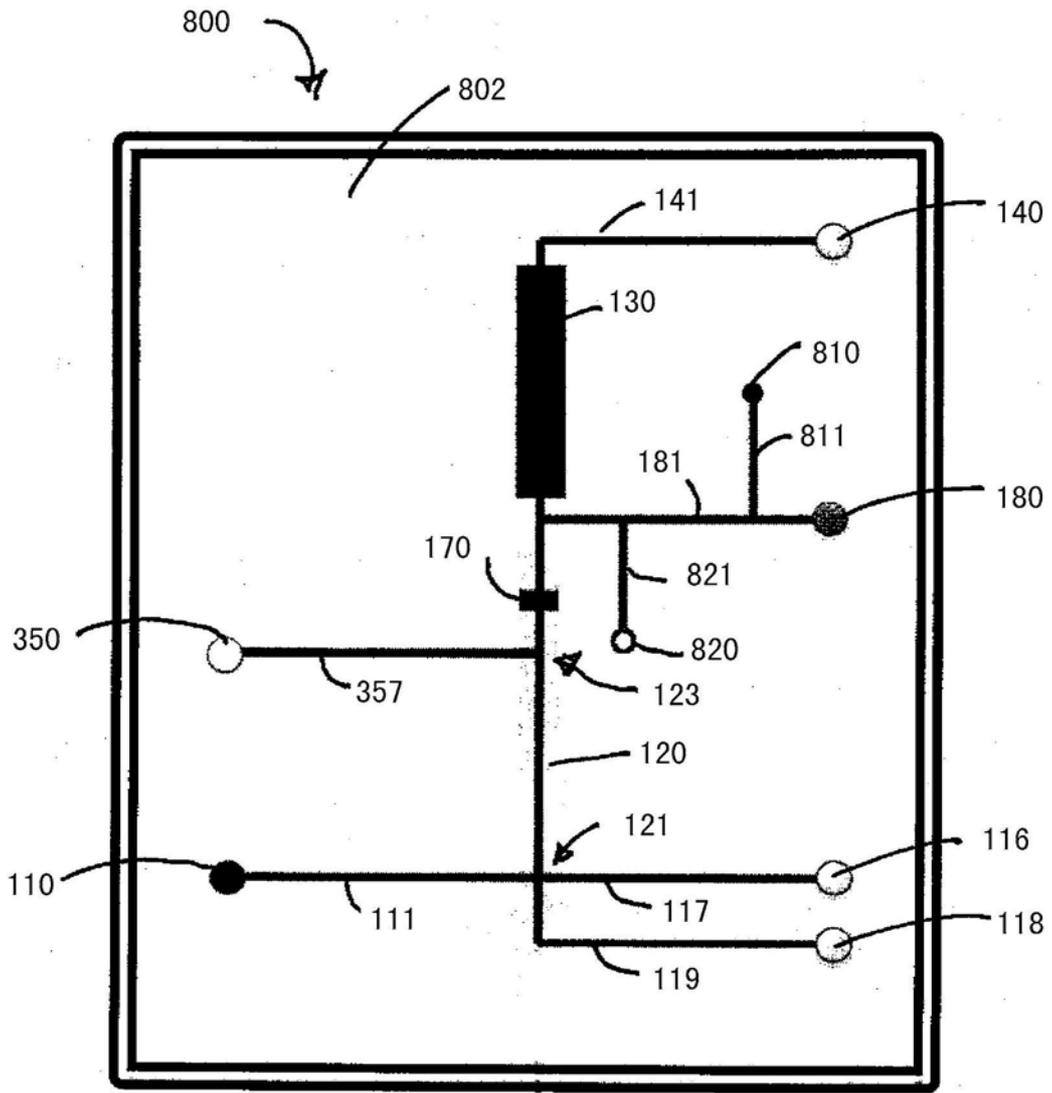


图7

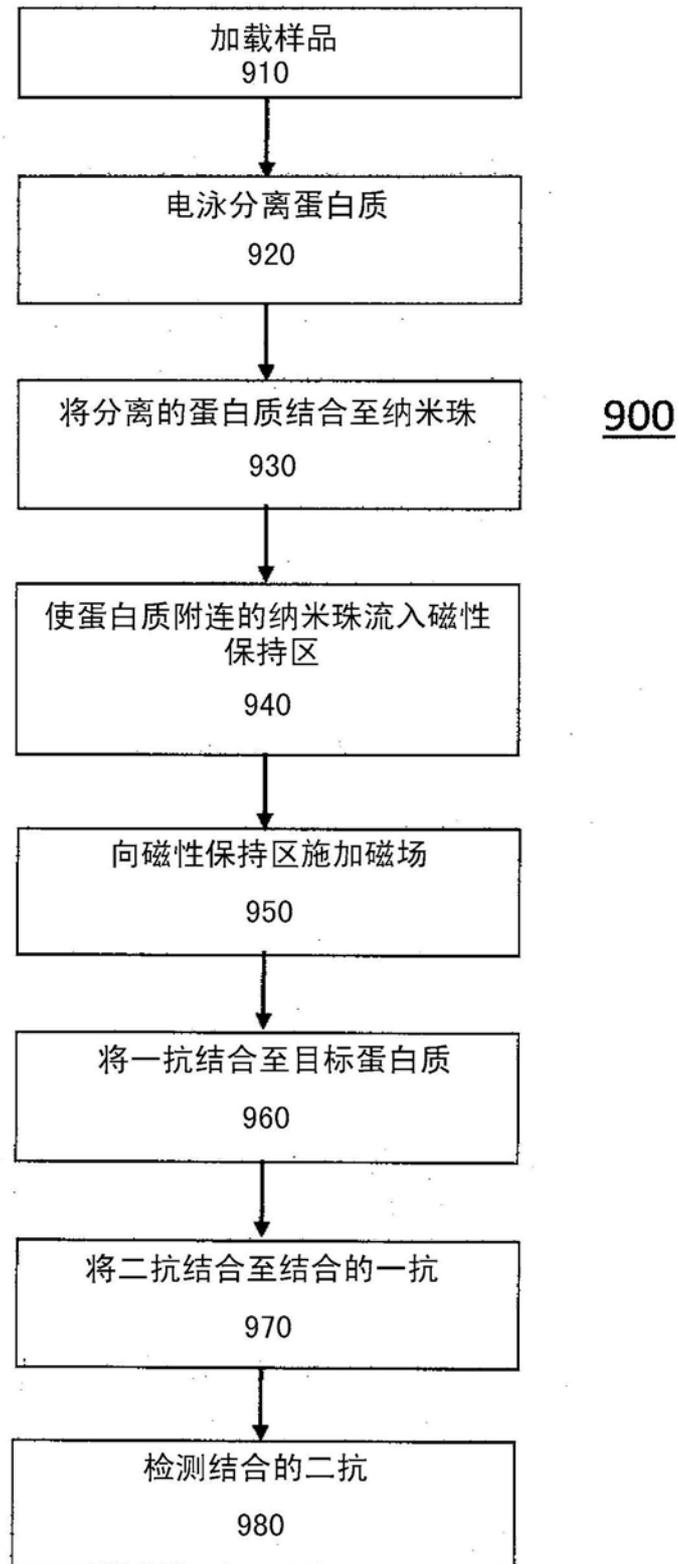


图8