



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110100179 A

(43)申请公布日 2019.08.06

(21)申请号 201880005165.4

(22)申请日 2018.02.13

(30)优先权数据

15/433,586 2017.02.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/018037 2018.02.13

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/152123 EN 2018.08.23

(71)申请人 烟台康体诊医疗科技有限公司

地址 山东省烟台市莱山区港城东大街1295
号百伟国际大厦

(72)发明人 张建棣

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/534(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/60(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

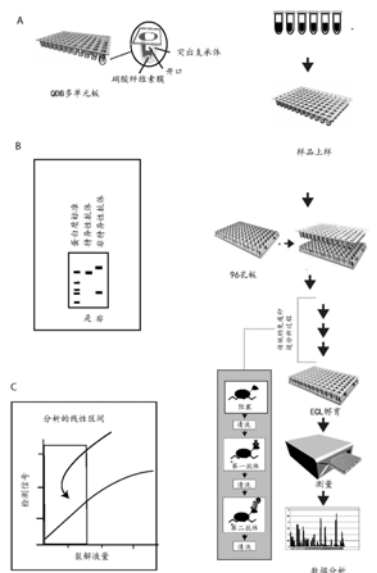
权利要求书2页 说明书12页 附图8页
按照条约第19条修改的权利要求书2页

(54)发明名称

一种高通量免疫印迹分析的方法和装置

(57)摘要

本发明提供了用于包括化学物质、多肽、核酸分子、或者细胞或病毒的原位释放的蛋白质分子的抗原含量的高通量免疫印迹分析的方法和装置。该方法能够提供高度敏感和准确的结果，适用于分析包括细胞和组织裂解液在内的复杂系统。



1. 一种表征抗原的方法,其包括:
 - (a) 结合抗原到复数的膜单元上,其中,使每个所述膜单元附着于复数的支承体的一个上;
 - (b) 选择同所述抗原相结合的第一抗体;
 - (c) 将所述第一抗体同所述抗原相结合以形成免疫复合物从而在所述复数的膜单元的每个中具有同其相连接的所述免疫复合物;
 - (d) 使所述免疫复合物发出信号;
 - (e) 检测来自所述复数的膜单元的每个中所形成的所述免疫复合物发出的所述信号。
2. 如权利要求1所述的方法,其中,所述免疫复合物通过选自于由标记酶、放射性同位素、DNA标记物、荧光标记物、电化学标记物及其混合物所构成的组中的标记物来进行标记。
3. 如权利要求2所述的方法,其中,

所述标记酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖氧化酶;并且所述荧光标记物包括藻红蛋白。
4. 如权利要求1所述的方法,其中,所述标记物直接同所述第一抗体相接合或者间接通过针对所述第一抗体的第二抗体相接合。
5. 如权利要求4所述的方法,其中,所述第一抗体或所述第二抗体或两者都预先用标记物进行标记。
6. 如权利要求1所述的方法,其中,所述免疫复合物发出的所述信号为光子或放射物。
7. 如权利要求1所述的方法,其中,从所述复数的膜单元的每个中的所述免疫复合物发出的所述信号是同所述信号的强度相对应的数值。
8. 如权利要求7所述的方法,其中,所述信号的所述强度不是来自于图像转化。
9. 如权利要求1所述的方法,其中,所述复数的支承体的每个通过连接构件来同平面结构相结合,其中所述连接构件包括第一端和第二端,所述第一端结合于所述平面结构,而所述复数的支承体中的一个同所述连接构件的所述第二端相结合,或者通过所述连接构件的所述第一端与所述第二端之间相结合。
10. 如权利要求1所述的方法,其中,所述膜单元是硝酸纤维素膜或PVDF膜,或者是表面覆盖的硝酸纤维素层或PVDF层。
11. 如权利要求6所述的方法,其中,所述光子通过标记物的颜色反应或者标记物的化学发光反应或者标记物的荧光发射来产生。
12. 如权利要求1所述的方法,其中,来自于所述复数的膜单元的每个的所述信号之间互不干扰。
13. 如权利要求1所述的方法,其中,还包括利用步骤(a)至(e)构建剂量曲线,其中所述剂量曲线使来自所述抗原的所述信号强度与样品量相关联,来自所述抗原的所述信号是从含有所述抗原的免疫复合物发出的信号。
14. 如权利要求13所述的方法,其中,所述剂量曲线具有所述抗原发出的信号强度同样品量实质上呈线性关系的线性区间。
15. 如权利要求14所述的方法,其中,所述样品是含有所述抗原的裂解液或者是所述抗原的标准品。
16. 如权利要求15所述的方法,其还包括:测量来自于预定量的所述裂解液中所述抗原

的信号强度,其中,所述裂解液的所述预定量位于所述裂解液的剂量曲线的所述线性区间。

17.如权利要求16所述的方法,其还包括:将所测量的信号强度同所述抗原的标准剂量曲线的线性区间中的所述抗原的量相关联以获得裂解液中的所述抗原的量。

18.一种用于免疫印迹分析的方法,其包括:

利用一种具有相互分离的复数的膜单元的多单元板,其中,每个膜单元含有膜;

结合含有抗原的裂解液到所述复数的膜单元的一个或多个上;

选择同抗原相结合的第一抗体;

结合所述第一抗体到所述抗原以形成附着到所述复数的膜单元的一个或多个上的免疫复合物,其中,所述第一抗体直接同标记酶相接合,或者通过一个或多个所述第二抗体间接同标记酶相接合;

从所述膜单元的一个或多个上检测免疫复合物中的所述标记酶发出的光信号。

19.如权利要求18所述的方法,其还包括:获得所述膜单元的一个或多个分别发出的所述信号并将所述信号的强度转化为数值。

20.如权利要求19所述的方法,其中,所述信号的强度并非基于所述信号形成的图像进行测量的。

21.如权利要求18所述的方法,其中,所述膜单元是硝酸纤维素膜或PVDF膜,或者是基材表面覆盖的硝酸纤维素层或者PVDF层。

22.如权利要求17所述的方法,其还包括:确立所述裂解液的剂量曲线,其中,导入所述复数的膜单元的一个或多个中的所述裂解液的量位于所述剂量曲线的线性区间。

一种高通量免疫印迹分析的方法和装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种针对抗原的高通量的免疫印迹分析的装置和方法。更具体而言，本发明涉及一种用于利用多单元板以实现快速、准确的免疫印迹分析的装置和方法。

背景技术

[0002] 蛋白质分析是现代生物学研究的重要基础。这项技术基于抗原-抗体相互作用的原理来测量目标抗原在各种医疗或实验条件下的表达水平。抗原指当进入人体时能够触发免疫系统产生抗体的外来分子。抗体由于其针对特定抗原的高特异性，成为临床、制药和生物医学研究中一个有力的工具。

[0003] 抗原包括但不限于，化合物、多肽、蛋白质、RNA分子、DNA分子、细胞（在原位释放的蛋白质）或病毒颗粒（在原位释放的蛋白质）。完整或部分抗原分子，可被引入到包括驴、山羊、兔子等宿主动物体内，产生大量针对目标抗原的抗体。此外，导入的抗原或抗原的一部分，可能具有一个或几个抗原决定簇，因此，由于抗原决定簇数目的不同，宿主体内可能产生一个或多个针对目标抗原的特异性抗体。

[0004] 一个典型的免疫检测过程可以分为三个主要步骤。第一步是点样，将制备的含有目标抗原的样品首先转移到诸如硝酸纤维素膜、PVDF膜或像具有结合蛋白质能力的多孔板之类的固相载体的表面上。第二步是形成并标记目标抗原抗体复合物（例如，免疫复合物）；这一过程又包括阻塞、孵育和清洗子步骤。在阻塞子步骤，膜上的非特异性蛋白质结合位点经阻塞液（blocking buffer）处理来避免抗体非特异性结合到膜上。经过阻塞后，在孵育子步骤中，膜和针对目标抗原的抗体的一起孵育，从而在膜上形成抗原抗体复合物；而未与目标抗原结合的抗体在这一过程中被洗掉。这里用的抗体一般是可购买的、预先标记的抗体。当然也可以原位通过一个标记子步骤来进行标记。在任一情形下，使用的抗体应该被标记，或者被标记物、例如标记酶（reporter enzyme）直接标记，或者通过由标记物标记的第二抗体进行间接标记。

[0005] 第三步是检测。对标记酶发出的信号进行检测并记录，从而提供与膜结合的免疫复合物的数量或者质量相关信息。在斑点印迹分析和免疫印迹分析中，免疫检测分析的最终结果可以进一步通过光密度分析的方法间接进行量化处理。

[0006] 在上述检测过程中，每个步骤在实践中都可能有所变化。例如，在第一步的点样中可以有多种变化。这些方法包括：斑点印迹分析中在膜上直接点样、在载玻片上放置组织切片，免疫印迹分析中样品通过凝胶转移至膜上，以及酶联免疫吸附法中样品对微孔板涂层。在形成免疫复合物的第二步中有更多的变化，包括各种处理方法和不同成分的阻塞液以达到保持膜上所形成的免疫复合物并同时避免抗体直接结合在膜上的目的。在大多数情况下，第一抗体（primary antibody）并不被直接用标记酶来标记。由标记酶直接或间接标记的第二抗体通过与第一抗体产生抗原抗体反应来标记在膜表面上与目标抗原结合的第一抗体。第二抗体（secondary antibody）也可以被进一步被像生物素的小分子标记。例如，链亲和素（streptavidin）耦合的辣根过氧化物酶可以被用来进一步提高信号。

[0007] 不同的标记方法也相应地需要不同的检测方法。例如,第三步的检测反应可以通过目测的颜色变化或者通过扫描仪、X射线胶片或酶标仪检测的化学发光信号。在检测过程中抗体也可以通过荧光加以标记,并利用扫描仪进行检测。

[0008] 在常规的免疫印迹分析过程中,标记的免疫复合物发出的信号首先通过X光片或扫描仪的方式获得图像(例如,深色的带或斑点)。然后利用图像处理系统(例如,色度分析仪)单独或者同图像分析软件(例如,ImageJ软件)一起或者在免疫组化中通过肉眼分析,对图像进行判断,决定免疫复合物的含量。

[0009] 在现有的免疫印迹分析方法中(例如,斑点免疫印迹分析、酶联免疫分析、免疫组化分析、西式印迹分析、反相蛋白质阵列分析)中,西式印迹分析(Western blot, WB)在基础研究中最为常用。在西式印迹分析中,含有目标抗原的制备的样品首先通过电泳的方式按照分子量分开,分开的蛋白质分子通过电转移的步骤转移到硝酸纤维素膜或者PVDF膜上。

[0010] 在随后的免疫检测过程中,在所制备的样品中的目标抗原的含量是通过在原位基于典型的标记酶的反应中得以检测,并通过光密度分析间接进行定量。例如,通过ImageJ软件,针对西式印迹分析中的胶的图像中的条带进行人工选择,然后利用软件对每条带进行量化。在这一过程中,免疫印迹检测的特异性是通过抗原抗体的特异反应和目标抗原预期的分子量来进行确认,因而避免了斑点免疫印迹分析中的非特异性信号干扰。

[0011] 酶联免疫分析可以多孔板的形式对信号进行直接定量。然而,酶联免疫板的蛋白结合能力一般少于 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。相反,用于传统的免疫印迹分析的膜,不管是PVDF膜还是硝酸纤维素膜,其蛋白结合能力在100到 $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。酶联免疫分析的低结合能力限制了它在实验室中的应用。

[0012] 在一个典型的免疫印迹分析中,抗原可以在变性的状态,例如在西式印迹分析中,或者可以在非变性的状态,例如在免疫组化或者酶联免疫分析中。

[0013] 简单地说,需要新的、改进的方法对复杂样品中抗原含量进行分析。这种方法应该易用、成本低、可以快速开发、而其在测量裂解液中抗原含量的结果应该至少不弱于西式印迹分析。

发明内容

[0014] 本发明提供了量化斑点免疫印迹技术(QDB),从而实现以高通量的方式快速、准确地对样品中抗原的含量进行定量。QDB方法免去了西式印迹分析过程中凝胶电泳的步骤。同现有的斑点免疫印迹分析相比较,提高了敏感性和可靠性,同酶联免疫分析相比较,其应用范围更广泛。

[0015] 在本发明的QDB方法的一种实施方式中,抗原结合于复数的膜单元。每个膜单元附着于复数的支承体(support)中的一个。挑选同抗原反应的第一抗体,第一抗体同抗原结合在膜的表面形成复数的免疫复合物。

[0016] 利用标记物对结合在复数的膜单元上的免疫复合物进行标记。标记的免疫复合物释放信号,例如,光子或者放射粒子。此外,标记的免疫复合物发出的信号通过机器进行检测。

[0017] 在某些实施方式中,标记物是标记酶,或者放射性同位素分子,核酸标志物,荧光标志物,电化学发光标志物,或者是他们的混合物。标记酶可以是辣根过氧化物酶(HRP),碱

性磷酸酶,或者葡萄糖氧化酶,而荧光标志物可以是藻红蛋白。另外,标志物可以同第一抗体相结合,也可以同结合到第一抗体的第二抗体相结合。

[0018] 在另一种实施方式中,复数的支承体可以是板的一部分来方便QDB分析(此后定义为QDB板)。QDB板有平面结构,有复数的支承体从平面结构的平面向外突出,支承体可以是任何结构,只要该结构可以结合一块膜并当该结构浸入溶液中,可以让膜同溶液相接触。相应地,支承体可以是一个中空的环状物。膜附着在环上。各支承体可以是杆状物或部分壁状物。此外,膜也可以被涂在或者被支承在一个固体表面上。一个QDB板的具体形状可以参考美国专利申请14/721,205(现在美国专利9933418)。

[0019] 在进一步的实施方式中,各支承体及其相连的膜和连接构件(单数或复数)组成一个膜单元,所以QDB板也可以称为多单元板。QDB板可以被塞入多孔板以形成组合板。在该组合板中,QDB板的膜单元被塞入多孔板中的相应孔中。

[0020] 在另一种实施方式中,多孔板的各孔中盛有溶液,例如,缓冲溶液,从而膜单元的膜可同溶液相接触。

[0021] 标记的免疫复合物释放的信号可以形成图像,也可以不形成图像。信号可以通过一个永久的媒介形成图像(例如,感光胶片)。永久媒介上的图像可以进一步通过光密度仪和一个图像处理软件提供信号的强度。

[0022] 在本发明的一实施方式中,从各膜单元发出的信号可以不需要首先转化为图像而得以检测。例如,从膜上发出的光信号(例如光子)首先被有光电倍增管的酶标仪收到,酶标仪直接以数值化的形式提供收到的信号总量。因为膜单元之间相互分离,从单独的膜单元获得的信号可以独立获得。从每个膜单元获得的信号直接转化为同结合在特定的膜单元上的被标记的免疫复合物的信号强度相对应的数字值。在进一步的实施方式中,信号的图像化和数字化(不通过图像)可同步进行。

[0023] 在上述的实施方式中,从一个膜单元的信号可以有效地同其他的膜单元发出的信号相分开。例如,放置膜的单元的管壁可以物理性阻塞来自其他孔内的膜单元的信号。从而导致信噪比(S/N比)大于常规的免疫印迹方法的结果。

[0024] 在另一种实施方式中,本发明提供了一种免疫印迹分析的方法,其包括:提供一种有复数的膜单元相互分离的多单元板,其中各膜单元包括膜;抗原同个或多个膜单元相结合;选择一种同抗原相结合的第一抗体;抗原同第一抗体相结合以形成结合在一个或多个膜单元的免疫复合物,其中第一抗体或者直接同标记酶相结合,或者间接地通过一个或多个第二抗体同标记酶相结合;以及,从一个或多个膜单元上检测结合在一个或多个膜单元上的免疫复合物中的标记酶发出的光信号。

[0025] 本发明提供的免疫印迹分析方法和装置保证了从单个膜单元发出的信号相互独立,从而降低了背景噪音干扰,提高了信噪比。相反,在传统的斑点印迹分析过程中,从单个点发出的信号难以同相邻的点发出的信号充分分开,导致检测的信号相互干扰,不准确。在本发明的有些实施方式中,从每个膜单元发出的信号(例如光)由膜单元之间的屏障物相互分开。这些屏障物可以是多孔板的孔壁。因而,从单个膜单元获得的信号同孔中抗原的含量更一致。可选地,膜单元自身的支承体也可以对光信号形成屏障。在附加的实施方式中可能还有另外的方式以达到上述目的,这些方式仍属于本发明涵盖的范围。

附图说明

[0026] 图1显示了本发明描述的QDB的一种实施方式。

[0027] 图2利用兔抗tubulin抗体显示一例检验抗体的特异性并在QDB分析中确立该抗体的剂量曲线。

[0028] 图3显示用QDB分析技术针对兔抗tubulin抗体对7只小鼠肝脏中tubulin蛋白含量进行测量的结果。

[0029] 图4显示了用QDB技术在细胞水平对特定的蛋白质分子含量进行大规模测量的实例。

[0030] 图5显示了一个运用QDB技术在组织水平测量特定蛋白质分子含量的实例，并同西式印迹分析进行比较。

[0031] 图6显示了一个运用QDB技术在组织水平进行大规模测量特定蛋白质分子含量，并从不同角度对结果进行分析的实例。

[0032] 图7显示了QDB的不同构成设计对QDB结果的影响。

[0033] 图8显示了几种不同抗体进行QDB分析的剂量曲线，说明QDB技术对抗体的依赖性。

具体实施方式

[0034] 在本公开中，除非另有定义，本文所用的所有科技术语与本专利所属领域的科技人员的理解并无不同。

[0035] 图1显示了本发明中的QDB分析的步骤和装置。在这一过程中，首先需要验证检测抗体的特异性。图1B显示了非限制性的利用西式印迹分析对抗体进行验证的实例。对于特异性的抗体，西式印迹分析应该只显示出一条位于预期分子量的位置的条带。任何检测出两条或者更多条带的抗体都是非特异的。只有特异性的抗体才可以用于QDB分析。

[0036] 另外，需要确立剂量曲线（也就是浓度反应曲线）以决定测量的线性范围。常用的方法是通过梯度稀释样品，然后构建信号和已知浓度的曲线，例如，剂量曲线（图1C）。剂量曲线的线性区间显示了在QDB分析中样品的上样量范围。不同的仪器以及方法上的变化可导致即使使用同样的样品也可以产生不同的剂量曲线。因此，同样的仪器和方法应该用来构建剂量曲线并分析待测样品。

[0037] 当特异抗体（如图1B所示）和剂量曲线的线性区间（图1C所示）被确认后，用来进行免疫检测分析的待测样品（例如，细胞和动物水平研究以及癌症研究）在被制备后被放入容器（图1D）。非限制性的样品可以包括化学物质、多肽、蛋白质分子、RNA分子、DNA分子、传统的含有两个重链和两个轻链的抗体分子、重组抗体分子及其一部分、细菌细胞、病毒颗粒、细胞、颗粒、或者由上述的任何两种或更多种分子相连的产品。样品然后被上样到一种特定的多单元板，也就是QDB板（图1E）。

[0038] 图1A显示了96单元的QDB板的一种实施方式的详细设计。该QDB板具有平面且该平面上设有复数的开口（在本实施方式设有96个开口）。各开口对应一个从平面向外突出（附图1A中朝向下方延伸）的孔。孔的“底部”是一块硝酸纤维素膜或是一个硝酸纤维素膜包埋的表面。在本实施方式中，孔壁有从板面到孔底的垂直的开口。如图1A所示，孔壁的开口允许了液体无障碍地流进流出孔中。而开口之间的部分将膜同板平面连为一体。事实上，QDB板的设计就是支承膜并将膜同板平面相连。例如，膜可以被一种支承体（例如环或板）进行

支持,同时可以由一个或多个杆状物连接膜和板平面。

[0039] 样品在膜上上样后,QDB板上的膜需要进行干燥处理。例如,在室温干燥1小时或者在37℃干燥15分钟。QDB板然后被放入一个多孔板(在本实施方式中为96孔)以形成组合板(图1F)。

[0040] 图1G显示了典型的阻塞和标记步骤。多孔板里注入阻塞液(TBST缓冲液含有5%的无脂奶粉)。将QDB板的膜插入普通的多孔板内并孵育1小时,然后进行清洗。接着,将QDB板与第一抗体(一抗)一起在4℃下孵育过夜或者在室温下孵育2小时,然后将QDB板在TBST缓冲液中清洗三次,每次5分钟。清洗后的QDB板同被辣根过氧化物酶预标记的第二抗体(二抗)按1:1000的比例孵育1小时。

[0041] 在测量步骤中,QDB板再次用TBST缓冲液清洗三次,每次5分钟,然后放入盛有ECL底物的96孔板1分钟(图1H)。然后将QDB板装入白色的96孔板中,利用预先设置为“有盖的板(plate with cover)”的选项的酶标仪直接进行定量(图1I)。由酶标仪所获得的信号将被用来编译数据并进行分析(图1J)。

[0042] 阻塞步骤、抗体孵育步骤和清洗步骤可以有多种变化。例如,在图1G中,如果只用到一种第一抗体,图1G的步骤可以在一个容器内完成。

[0043] 在有些实施方式中,阻塞液可以是在含有5%的无脂奶粉或3%的牛血清蛋白的PBS或TBS缓冲液并添加含有0.1%的吐温20。膜可以直接在室温下干燥,也可以在通风加热的空间以加快干燥过程。

[0044] 信号的标记和检测可以包括:抗体或分子的酶耦合(enzymatic coupling),抗体的放射性同位素标记,或者抗体或分子的荧光标记。其检测结果可以通过在呈色反应中观察或者当抗体被同位素或标记酶标记时利用X光片来获得。

[0045] 在本QDB技术的实施方式中,QDB板的各单元(subunit)的膜相互分开,因此QDB板可同时分析不同的样品。另外,各样品在被标记后可以独立于其他样品进行定量。

[0046] 在进一步的实施方式中,抗体首先用辣根过氧化物酶标记,利用该酶将ECL底物转化为化学发光信号。信号的强度通过利用对化学发光敏感的胶片或扫描仪显示,并进一步通过密度仪进行间接定量。QDB分析直接利用酶标仪对每个样品发出的信号进行测量。信号的强弱直接数字化,而不需要首先利用胶片或扫描仪将信号转化为图像。

[0047] 相反,在斑点免疫印迹分析和西式印迹分析过程中,信号的检测依赖于通过胶片和扫描仪获得的图像。在图像向数字的转化过程中,非常难于准确地确立分析的线性区间。而QDB分析需要首先确立剂量曲线,从而保证操作人员在剂量曲线的线性范围内上样。

[0048] 还有,在斑点和西式印迹分析中,用于分析的样品量主要基于实验人员的经验来决定的。在大多数情形下,每个样品需要大约20μg到100μg用于分析。相反,在QDB分析过程中,由于敏感性的提高,每个样品只需要少于10μg,例如0.1到3μg样品就足够产生准确的结果。

[0049] 同酶联免疫分析相比较,酶联免疫法的蛋白质结合能力一般少于1μg/cm²。QDB分析因为采用了硝酸纤维素膜,因而具有更好的蛋白质结合能力,例如100到200μg/cm²。此外,QDB板的一个显著特征在于其各单元(subunit)都允许缓冲液在单元内自由流入流出,所以在各单元的膜同酶联免疫分析中封闭的孔相比较,清洗得更彻底。这个设计实现了对膜的有效清洗,降低了检测步骤中的背景噪音干扰。

[0050] 这里的“膜”的定义涵盖最广泛的范围。膜可以是任何具备同硝酸纤维素膜或PVDF膜有相似的结合能力、足够的孔径以允许检测抗体接近、以及对抗原足够的表面亲和力的材料。膜可以包埋或者依附于平面或曲面的材料上以保证其一面可以同底物接触。膜也可以依附于一个中空的结构以便于膜的两面都暴露出来并易于抗体接近。所有这些材料能够以恰当的形状(如膜、片或板状)加以使用。或者,他们也可以涂抹或粘合或层压到适当的塞入载体(如纸张、玻璃、塑料或织物)上。例如,膜可以指但不限于硝酸纤维素膜、PVDF膜。

[0051] 对膜的形状和结构不做任何限制,只要其提供了抗原的结合表面即可。每个膜单元内的膜可以是连续的,也可以不连续的,可以形成为一体,也可以形成为多部件,只要它们在每个单元内结合同一样品即可。

[0052] 这里的“标记酶”的定义也覆盖最广泛的范围。标记酶可以指任何在免疫检测分析中对抗体的修饰以辅助对抗体的检测。例如,标记酶可以指,但不限于,抗体被放射性同位素,如碘离子¹²⁵直接标记,或者是像碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶的标记酶。对被标记的抗体的标记酶数量的检测是通过形成可检测的产物得以完成。该产物可以具有放射性或化学发光或产生荧光;或者可以是产生在可见光内或可见光之外具有特征的吸收或反射光谱的产物。当补体被用于检测结合的抗原-抗体复合物时,它可被上述方式中的任一种加以标记,或者通过特定的抗补体的抗体来加以检测。

[0053] 标记酶可以是,但不限于抗体间接被放射性同位素(如碘离子¹²⁵)、或者被标记酶(如碱性磷酸酶或者辣根过氧化物酶)来标记。抗体可以但不限于,被间接地通过第二抗体进行标记,而第二抗体可以直接或间接地被放射性同位素(如碘离子¹²⁵)或者标记酶(如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)进行标记。在一种实施方式中,第二抗体被生物素标记,并间接地通过被辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)标记的链亲和素分子进行标记。

[0054] 本文所用的“抗原”和“抗体”的定义也涵盖最广泛的范围。“抗原”可以指一种化合物、细胞、病毒或一种粒子。“抗原”可以指一种化合物、肽、蛋白质、RNA分子、DNA分子、细胞(在原位释放的蛋白质)或病毒颗粒(在原位释放的蛋白)、或者任何可导致宿主动物(包括人类)产生一种或多种抗体的分子。抗原也可以指由上述分子或基团中的任何两种或多种交联在一起的产物。抗原可以存在于单纯的形式,也可以存在于混合物的形式。抗原可以存在于未修饰的形式,也可以存在于经修饰后的形式(例如,被化学物质(chemical)修饰)。

[0055] 抗原可以存在于变性的形式,也可以存在于非变性的形式。非变性的形式应该涵盖最广泛的范围。其可以是天然的形式,或者它包括了抗原没有同变性剂(如DTT和巯基乙醇)相接触、或者虽然同变性剂接触,但其量不足以彻底导致抗原变性的状态。

[0056] 本文的“抗体”的定义也涵盖最广泛的范围。“抗体”是同“抗原”结合的多肽。抗体包括但不限于,传统的抗体,含有抗原结合位点的传统抗体的一部分,含有抗原结合位点的重组抗体,同抗原结合的蛋白质,或者由上述情况中的任何两种或多种形式交联在一起的产物。抗体可以是单纯的存在形式或者是混合物的存在形式。抗体可以存在于未修饰的形式,也可以存在于经修饰后的形式(例如,被化学物质修饰)。

[0057] 实验方法

[0058] 本发明披露了下列非限制性实施例。在不违背本发明的范围和内涵的情况下,这些例子可有所变化。

[0059] 用于细胞培养相关试剂,包括细胞培养基和细胞培养皿,从位于美国马萨诸塞州

Waltham市Thermo Fisher Scientific公司购买。HEK293细胞购自于中国科学院细胞库(中国上海)。QDB板由烟台载通生物技术有限公司制造。蛋白质酶抑制剂购之于美国密苏里州St.Louis市Sigma Aldrich公司。所有其他的化学药品购买于中国北京国药集团化学试剂有限公司。

[0060] 小鼠株:TRAMP小鼠及其野生型同窝仔从Jackson实验室购买(www.jax.org)。这些小鼠源于C57BL/6,通过和C57XC57交配获得。这些小鼠在12/12小时光暗周期,自由获得水和食物的条件下饲养。所有的动物实验方案都经过滨州医学院伦理委员会批准(ER#2016-19)。动物的遗传背景和肿瘤的确证在另外的文章中有描述。

[0061] 抗体:兔抗tubulin(YT-0183)抗体、兔抗ApoE(YT-0273)抗体购买于中国苏州Immunoway公司。兔抗p65(SC-372,C20,F0414),兔抗CDK4(SC-260,C22,A0314)购买于美国加州Santa Cruz市Santa Cruz生物技术公司。兔抗CAPG(14213-T52)购买于中国北京Sino Biologic公司。

[0062] 稳定克隆的筛选:为了构建持续表达的RNA干扰质粒,从美国加州Palo Alto市的System Biosciences公司的pGreenpuro质粒按照制造商的指南并利用针对p65蛋白的目标顺序5' 'GGACATATGAGACCTTCAAGA 3' 来制备ShRNA-p65质粒或者针对荧光素酶的目的顺序5' GTGCGTTGTTAGTACTAATCCTATTT 3' 来构建ShRNA-luciferase质粒。按照制造商的指南,利用Fugene 6转化试剂,利用ShRNA-p65和ShRNA-luciferase质粒并针对两个60mm的培养皿中 5×10^5 /皿的密度下的HEK293细胞进行转化。细胞在生长培养基(DMEM培养基补充有10%胎牛血清)生长两天,然后被换到新鲜的选择培养基(生长培养基补充有5 μ g/mL的嘌呤霉素(puromycin))。

[0063] 每3到4天的时间换掉一次选择培养基,直到出现肉眼可见的克隆。利用从Sigma公司购买的克隆柱,经胰蛋白酶处理后挑选单独的克隆,然后按1:9的比例转移到两个平行的24孔板的孔中,其中,A板有更多的细胞而B板有较少的细胞,对这两个板用同一克隆号标记。细胞在选择培养基的条件下继续生长直到长满A板。

[0064] 向A板直接加入补充有蛋白质酶和磷酸酶抑制剂(100mM NaF,0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride,5 μ g/mL pepstatin,10 μ g/mL leupeptin,5 μ g/mL aprotinin)的裂解缓冲液(50mM Hepes,pH 7.4,137mM NaCl,5mM EDTA,5mM EGTA,1mM MgCl₂,10mM Na₂P₂O₇,1% Triton X-100,10%甘油),由此制备全细胞裂解液(total cell lysates)。全细胞裂解液经5分钟离心后,收集上清液,并直接加入样品缓冲液进行QDB分析。

[0065] 根据来自A板的QDB分析结果,从B板中挑选有代表性的克隆,以 2×10^5 /皿的密度转移到两个60mm的培养皿中,使细胞在选择培养基中生长两天,然后用来制备全细胞裂解液并测量蛋白浓度(看下一部分)或者储存到液氮中。

[0066] 细胞和组织中蛋白提取:对于HEK293细胞,收集细胞并在细胞裂解液中用自动移液器上下吸进吸出50次。经8000 $\times$ g离心5分钟后,收集上清液,并用来自Thermo Fisher公司的Pierce BCA蛋白定量试剂盒对总蛋白浓度进行测定,然后加入用于西式印迹分析的样品缓冲液。当制备小鼠肝脏和前列腺的组织裂解液时,组织被切成小块,放入预先盛有300 μ l加有蛋白质酶抑制剂的裂解液的微型离心管中。用手持式破碎仪破碎一分钟,然后在8000g离心5分钟。来自每个管子的上清液被用来自Thermo Fisher公司的Pierce BCA蛋白

定量试剂盒对总蛋白浓度进行测定及用于西式印迹分析。

[0067] QDB过程:根据经过QDB分析确立的剂量曲线,将制备的全裂解液样品调整在0.1 μ g到4 μ g/单元之间,直接在QDB板的每个单元膜上上样。将QDB板在室温下放置45分钟或者在37 $^{\circ}$ C下放置15分钟以保证膜彻底干燥,然后在转移缓冲液(transfer buffer)中短暂放置。用TBST缓冲液(137mM NaCl,2.7mM KCl,20mM Tris,pH7.4,0.1%Tween-20)清洗QDB板三次,用阻塞液(TBST加5%脱脂奶粉)在一个容器中进行阻塞。然后将QDB板与第一抗体共同在4 $^{\circ}$ C下孵育通宵或者在室温下孵育2小时。如果整块板用同一个抗体,板可以放在一个大容器内,不然,QDB板则需要放置在一个盛有不同第一抗体的96孔板内。QDB板再次用TBST缓冲液清洗3次,然后同第二抗体孵育2小时后再次被TBST清洗三次,每次5分钟。将QDB板放入一个盛有100 μ L/孔的ECL底物的96孔板1分钟,然后塞入1个白色的96孔板,利用Tecan P200型酶标仪对化学发光信号进行定量测试。在用户页面上需要选择“有盖的板”选项,以避免在测量过程中由于两块板叠加导致同仪器不相容。

[0068] 统计分析:所有数据以平均值 $\pm$ 标准误差表示。两组数据之间通过双尾学生t检验方法进行分析。q-q图通过SPSS v22.0 (IBM,Chicago,IL) 获得。

[0069] 实施方式

[0070] 实施例1:

[0071] 小鼠肝脏裂解液按照实验方法描述的步骤进行制备,全组织裂解液重新溶解在4XSDS的样品缓冲液(Laemmli缓冲液)中,然后在75 $^{\circ}$ C下加热5分钟。HEK293细胞裂解液和小鼠组织裂解液按40 μ g/泳道上样并用兔抗tubulin抗体进行西式印迹分析。图2A显示只有一条同预期 β -tubulin的大小相应的条带在膜上。

[0072] 对小鼠肝脏的裂解液进行稀释,以获得从0.1mg/单元到12mg/单元的梯度样品。每个样品按3 μ L/单元上样到如图1A所示的QDB板每个单元的膜底部。上样后的板在室温下放置45分钟以保证其完全干燥。

[0073] 上样后的QDB板用阻塞液(Tris缓冲的生理盐水中添加5%的脱脂奶粉和0.1%的Tween20(通常称为TBST)阻塞1小时。然后,QDB板同兔抗tubulin抗体在按1:2000稀释的阻塞液中通宵孵育。

[0074] 在经过用TBST3次清洗、每次5分钟后,QDB板同辣根过氧化物酶标记的驴抗兔二抗孵育1小时。经过3次清洗、每次5分钟后,QDB板被放入一个96孔板中,按照制造商指南加入100 μ L/孔的化学发光底物。QDB板在放置在96孔板的溶液中1分钟后,被转移到一个白色的96孔板中利用Tecan酶标仪进行定量测量。

[0075] 图2B显示了利用肝脏裂解液和抗tubulin抗体建立的两个剂量曲线。每个点代表了三次测量的平均值和标准误差。空心圆代表了通过QDB分析得到的信号(QDB信号)。实心圆代表通过西式印迹分析研究得到的结果(WB信号)。图2B的插图显示了在0到1 μ g范围内的QDB剂量曲线中化学发光信号和裂解液量呈线性关系,其相关指数(R^2)达到0.999。在1 μ g到12 μ g之间,QDB信号逐渐趋于饱和,QDB剂量曲线不再呈线性关系。

[0076] 同样的样品量被用来进行西式印迹分析。图2C显示的WB的信号是通过利用Li-Cor公司(美国内布拉斯加州Lincoln市)的Image Studio Digits软件分析获得的,显示为实心圆。然而,WB的剂量曲线表现不规则,其相关指数为 $R^2=0.907$ 。在WB的剂量曲线中,难以得到可靠的线性范围。相对照的是,QDB分析得到了准确的线性应用区间($R^2=0.999$)。

[0077] 该例显示了如何确立检测抗体的特异性,以及如何利用特定的抗体和样品确立QDB分析的线性区间。用同样的样品,在相同的实验条件下对QDB分析和西式印迹分析进行比较显示了QDB技术的定量本质与西式印迹分析的半定量本质的不同。

[0078] 实施例2

[0079] 在本实验中,从7只小鼠中准备大小相近的肝脏块,按实验方法中描述的方法进行匀浆。从每个小鼠肝脏裂解液(20 μ L)中取同样的蛋白总量(40 μ g蛋白总量/泳道)用来进行西式印迹分析。图3A显示了对7个小鼠肝脏中 α -tubulin含量应用西式印迹分析得到的结果。用图3A所用的同样的小鼠肝脏裂解液按0.5 μ L、大约1 μ g蛋白总量/单元的量在QDB单元上点样,重复三次。结果为每个小鼠自于三点的平均值 $\pm$ 标准误差。图3B显示了利用QDB技术测量 α -tubulin含量的结果。来自同一只小鼠的裂解液分别用西式印迹分析和QDB分析的结果为了便于比较,上下排列在一起。在图3C中,来自WB的信号(通过Image Studio Digits量化)和QDB分析结果进行简单线性回归分析,其相关性为 $R^2=0.85$ 。小鼠的编号为出于记录的目的对单个小鼠的指定编号。

[0080] 同实施例1一起,实施例2显示了一个完整的QDB分析过程,并同西式印迹分析方法进行比较。

[0081] 实施例3

[0082] 图4A显示了用兔抗p65蛋白抗体对HEK293细胞裂解液进行西式印迹分析的结果。HEK293细胞裂解液按照实验方法描述的方法制备。用购自于Santa Cruz公司的兔抗p65蛋白的抗体对50 μ g/泳道的细胞裂解液进行西式印迹分析。用购自Li-Cor公司的印迹扫描仪对整个膜进行扫描分析。

[0083] 为了构建剂量曲线,对HEK293细胞裂解液进行梯度稀释,然后在QDB板上进行三点重复点样。上样后的QDB板按照方法描述的方式进行处理,用ECL通过Tecan酶标仪进行定量。图4B显示了剂量曲线。在0到9 μ g细胞裂解液之间,简单线性回归曲线分析得到相关性指数 $R^2=0.992$ 。

[0084] ShRNA-p65和ShRNA-Luciferase质粒通过Fugene 6转染试剂转染到HEK293细胞中。通过肉眼观察,利用5 μ g/mL的Puromycin从转染了ShRNA-p65(p65克隆)和ShRNA-Luciferase(Luciferase克隆)的细胞中对稳定克隆进行筛选。

[0085] 挑选后的克隆按1:9的比例被转到两个24孔板里(板A和板B)。Luciferase克隆被标记为L1到L5,p65克隆按顺序标记。

[0086] 对生长有大量细胞的板(板A)每天进行观察直至细胞长满孔。这些细胞被收集起来按实验方法所述制备细胞裂解液。来自于单个克隆的细胞裂解液被用来通过QDB分析测量tubulin和p65的含量。p65蛋白的相对含量(例如,p65含量和tubulin含量的比值)用来比较每个克隆内源p65的表达水平,各Luciferase克隆内p65蛋白表达水平的平均值定为1。图4C显示了分析结果,每个点代表三次三点重复实验的平均值。

[0087] 图4D对p65克隆和Luciferase克隆中p65相对含量进行了比较。p65克隆和Luciferase克隆首先按照实验方法所述进行筛选。对每个克隆的p65相对含量分别进行计算,然后取平均值对luciferase克隆和p65克隆的内源水平在群体水平上进行比较。出于比较的目的,5个luciferase克隆的平均值任意设定为1。 $^* : p < 0.05$,其显著性通过学生t试验计算。p65的相对水平大约为0.8。

[0088] 同时,根据图4C显示的结果,代表性的克隆从细胞少的24孔板(B板)中被挑选出来,转移到60mm的培养皿中。当细胞长到足够的数量时候,被用来利用抗p65和抗tubulin的抗体进行西式印迹分析。图4E的下图显示了p65和tubulin的西式印迹分析结果。图4D显示的QDB分析结果被在4E上重新作图。挑选细胞水平的稳定克隆是生物科研中一个常用的方法。

[0089] 在这个例子中,我们通过展示从HEK293细胞中挑选转染有RNAi质粒的稳定克隆的过程,表明QDB技术可以在细胞水平进行。

[0090] 实施例4

[0091] 这一组试验评估了小鼠前列腺组织中CAPG蛋白的相对含量。从HEK293细胞和小鼠前列腺组织中制备的裂解液按50 μ g/泳道用抗CAPG抗体进行西式印迹分析。完整的膜被购自于Li-Cor公司的印迹扫描仪扫描。图5A插图显示了用西式印迹分析验证抗体特异性的结果。

[0092] 图5A显示了利用QDB分析确立的剂量曲线。来自多个小鼠前列腺组织的裂解液被混匀,并从0.1 μ g到4.8 μ g梯度稀释,并用来用抗CAPG抗体进行QDB分析。

[0093] 利用QDB分析得到的CAPG相对含量结果同西式印迹分析结果进行比较。从每个以指定编号标记的小鼠中采集前列腺组织,在QDB分析过程中,2 μ L(每个样品约有1 μ g蛋白裂解液)前列腺组织裂解液被三点重复,以用来测量每个小鼠体内tubulin和CAPG的含量以及每个小鼠CAPG的相对含量。CAPG相对含量表达为CAPG含量和tubulin含量的比值,如图5B所示。同时,用于西式印迹分析的每个样品的裂解液上样量根据QDB对tubulin的分析结果进行调整,以保证等量上样。随后,通过西式印迹分析对CAPG在这些样品中的含量进行测量。具体到44号小鼠,大约30 μ g的裂解液被用于分析。西式印迹分析结果在图5B的下列显示。西式印迹分析结果通过来自Li-Cor公司的Image Studio Digits的软件进行数字化。图5C显示了西式印迹分析和QDB分析很好的相关性,其相关性指数(R^2)为0.96。

[0094] 这个例子通过同西式印迹分析结果比较,显示了QDB分析方法在评估不同小鼠的前列腺组织中CAPG含量的可靠性。

[0095] 实施例5

[0096] 这一组实验比较了来自野生型和TRAMP(转基因小鼠前列腺恶性腺瘤)小鼠的前列腺组织中CAPG蛋白的相对表达水平。前列腺组织分别采集于野生型和TRAMP小鼠。制备的组织裂解液被用来进行QDB分析以测量CAPG和tubulin的表达水平。CAPG的相对水平表达为CAPG水平和tubulin水平的比值,并按基因型分组计算平均值。结果为三组独立的三点重复实验结果的平均值。根据学生t实验分析, $p=0.6723$ 。野生型和TRAMP小鼠的CAPG相对含量分别为 8.243 ± 0.372 au和 11.835 ± 0.238 au(au:任意单位),如图6A所示。

[0097] 同样的QDB结果重新按照年龄和遗传背景作图,如图6B所示。

[0098] 图6C显示了利用分类方法,根据遗传背景和年龄对CAPG相对水平进行比较。左边的两组数据来自于12周大的19只野生型和19只TRAMP小鼠的平均值,右边两组数据为15-18周大的18只野生型小鼠和13只TRAMP小鼠的平均值比较。*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; 基于学生t试验分析方法。

[0099] 这些结果显示,作为12周小鼠CAPG的平均值,野生型为 0.643 ± 0.082 ,TRAMP为 0.963 ± 0.107 ;作为15-18周小鼠,野生型为 0.685 ± 0.133 ,TRAMP小鼠为 0.250 ± 0.025 。

[0100] 本实施例显示了QDB技术可应用于在动物组织水平对特定蛋白分子进行大规模分析。图6B和6C进一步表明图6A的数据可以不同的方式分析并显示分析结果。

[0101] 实施例6

[0102] 本研究采用了两种QDB板(A型和B型)。A型板如图1A显示,在包围膜的垂直的环上有两个开口。B型板除了在包围膜的垂直的环上没有开口之外同A型板相同。因此,A型板允许液体通过环上的开口自由流动,方便对膜的清洗。B型板则会有薄薄的一层液体积聚在垂直的环内,妨碍了膜表面和清洗溶液之间液体的自由交换。

[0103] 抗ikB抗体被用来进行浓度反应。A型板和B型板分别有48个膜单元,可被共同放置于同一96孔板中。细胞裂解液按照Zhang J 2007描述的方法制备,在含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中使用手持式匀浆器从冷冻组织制备小鼠肝脏裂解液,并用BCA方法测量蛋白浓度。全细胞裂解液被融入 $4\times$ SDS样品缓冲液(Laemmli缓冲液)在75℃加热5分钟。将样品进行梯度稀释,然后分别在A型板和B型板的每个膜单元中上样。样品在室温下干燥45分钟。两种板同时被阻塞液(5%的无脂奶粉融入Tris缓冲的生理盐水,添加有0.1%的吐温20,即统称的TBST)阻塞处理1小时,然后将样品同以1:2000含有兔抗tubulin抗体的阻塞液在4℃通宵孵育。经TBST 3×5 次清洗后,再同被辣根过氧化物酶标记的驴抗兔二次抗体一起进行孵育。

[0104] 用TBST再次清洗 3×5 分钟,再将A型板和B型板塞入96孔板中。加入100μL按照制造商的说明混匀的ECL底物。将上述板放置在96孔板中1分钟,然后转移到一个白色的96孔板中。将复合的板塞入Tecan酶标仪中,选择酶标仪操作菜单中的“有盖的板”选项进行测量。

[0105] 图7显示了剂量曲线。来自于A型板的剂量曲线同来自于B型板的剂量曲线相比,其强度高于两倍。来自于A型板的剂量曲线也表现出更好的线性(A型板的 $R^2=0.9941$,而B型板的 $R^2=0.983$)。该效果可能归结于A型板能得到更好的清洗,从而导致膜清洗的更干净,背景噪音干扰更低。

[0106] 该实验显示彻底的清洗提高了数据的质量。

[0107] 实施例7

[0108] 这一组实验调查了不同抗体在QDB分析中的线性范围。图8A并列显示了抗ANXA6抗体对小鼠前列腺裂解液进行分析的QDB剂量曲线(从0到4μg)以及其线性范围(从0到1μg)。该剂量曲线在线性范围内的相关指数 $R^2=0.996$ 。同样,图8B并列显示了抗Actin抗体对小鼠肝脏裂解液进行QDB分析的总的QDB剂量曲线及其线性范围。信号通过利用生物素-链霉亲和素系统进一步增强。在该例中,其线性范围为0到0.5μg,相关指数 $R^2=0.996$,从而允许利用少量的样品用于QDB分析。

[0109] 图8C显示了利用抗CALR抗体对小鼠肝脏裂解液进行QDB分析的总QDB剂量曲线(从0到1μg)及其线性范围(0到0.25μg),其线性范围的相关指数 $R^2=0.998$ 。

[0110] 我们的结果显示不同检测抗体的剂量曲线各不相同。在大规模的QDB分析之前,需要对检测抗体进行评估并确立其剂量曲线。

[0111] 可能存在不同于上述各例的变化,例如,现有的QDB方法可以用来进行酶联免疫分析。在这种情况下,将同量的A抗体直接结合的QDB的每个膜单元的底部。QDB板然后通过阻塞液进行阻塞,然后将一种或几种待分析样品加入QDB板的膜单元。经清洗后,将同量的直接或间接被标记酶标记的B抗体加入QDB板的各个膜单元。对该板进行再次清洗。在QDB板的

膜单元上形成的免疫复合物通过检测试剂直接或者间接进行测量。

[0112] 除了用标记酶、如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖氧化酶标记外,本发明中标记可使用任何免疫分析的标记方法、包括同位素标记、DNA标记(例如在实时免疫定量PCR分析中)、荧光标记(例如藻红蛋白标记)、电化学标记等。

[0113] 本发明实施方式中可以使用任何可购买的酶标仪。酶标仪也可以用不同的检测技术对信号进行检测,例如光吸收光、荧光、化学发光、时间分辨荧光(time-resolved fluorescence)、荧光极化等方法。

[0114] 需要说明的是我们所列举的示范性实施方式指现有的常用或优选的实施方式,因而应该被视为出于描述的目的,而不是出于限制的目的。在各实施方式中描述的特征和特性应被视为在不同实施方式中不同的特征和特性的代表。

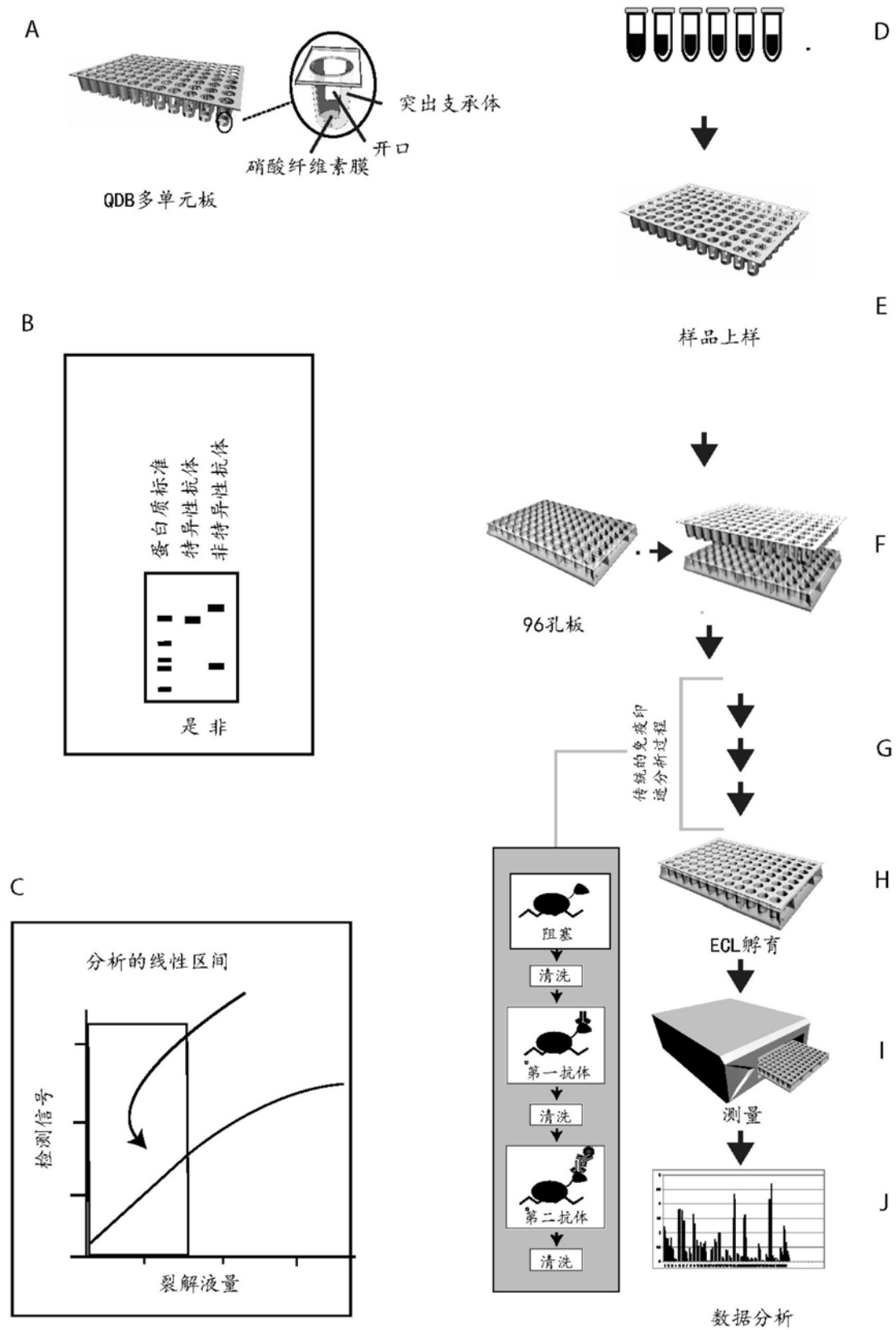


图1

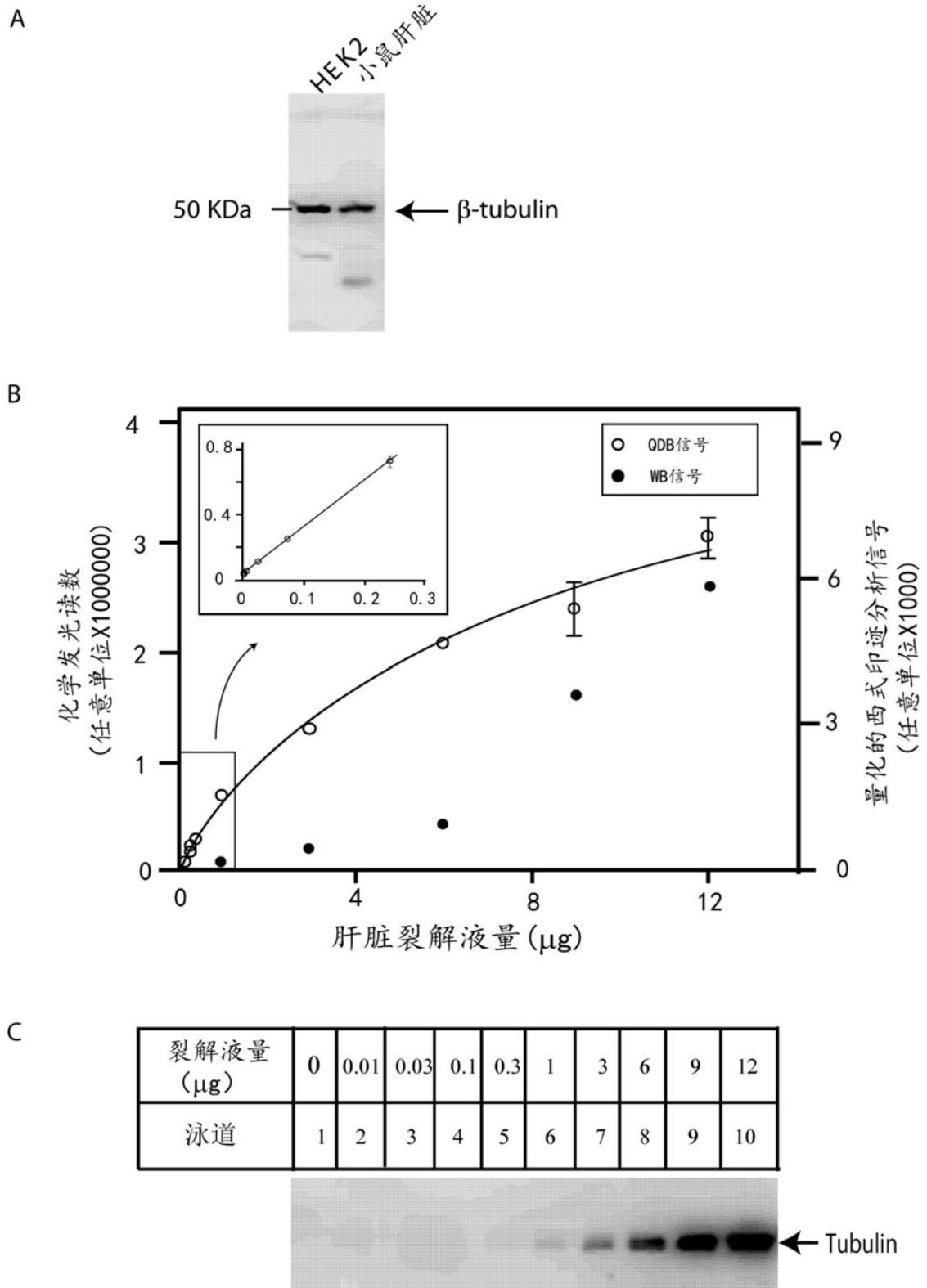


图2

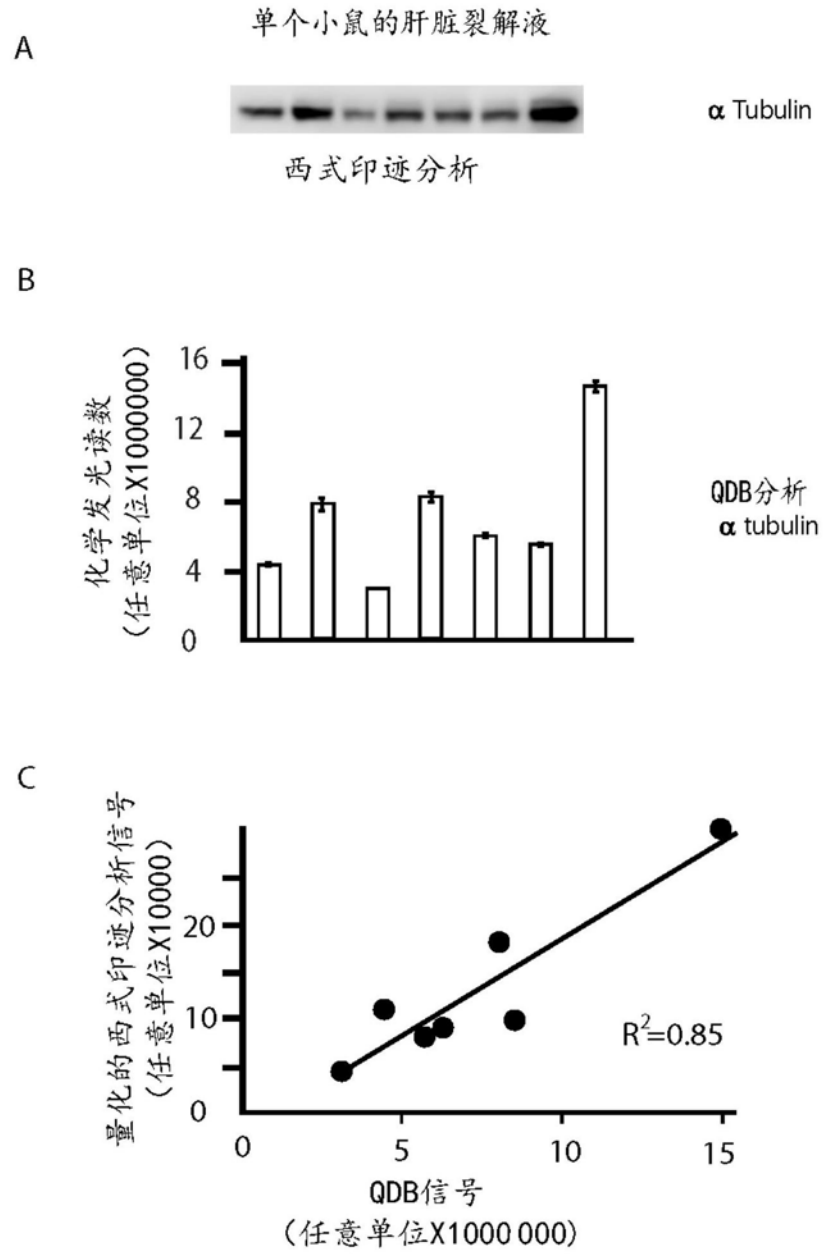


图3

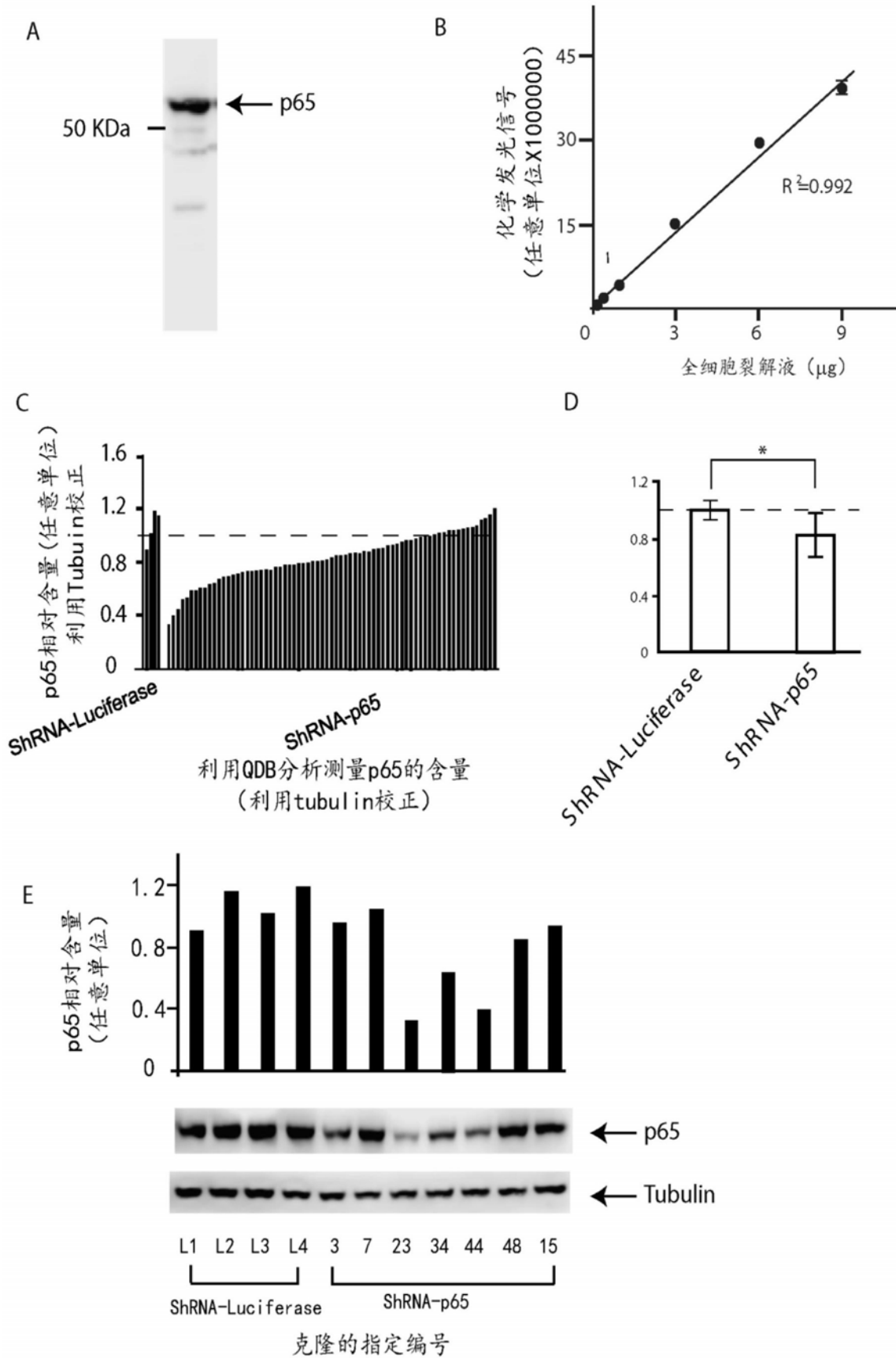


图4

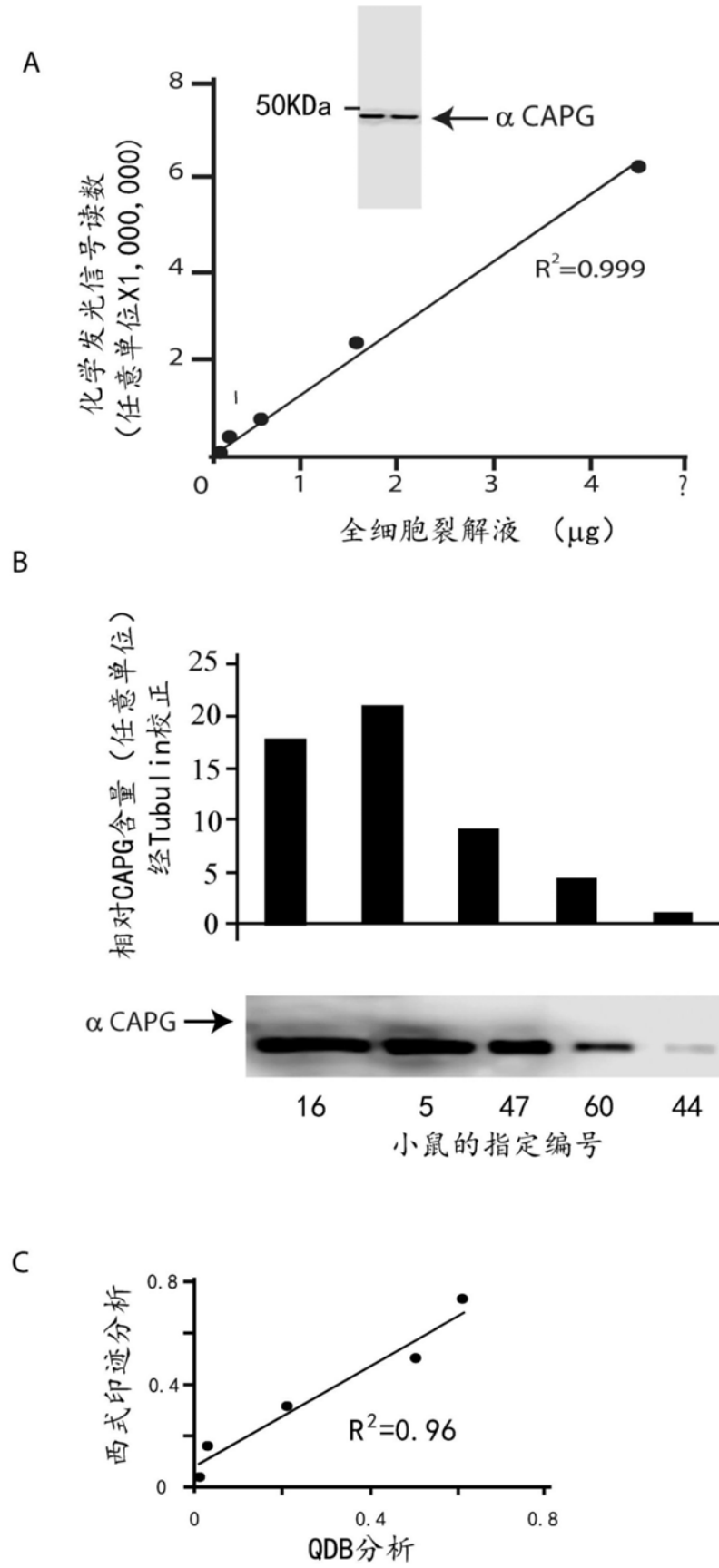


图5

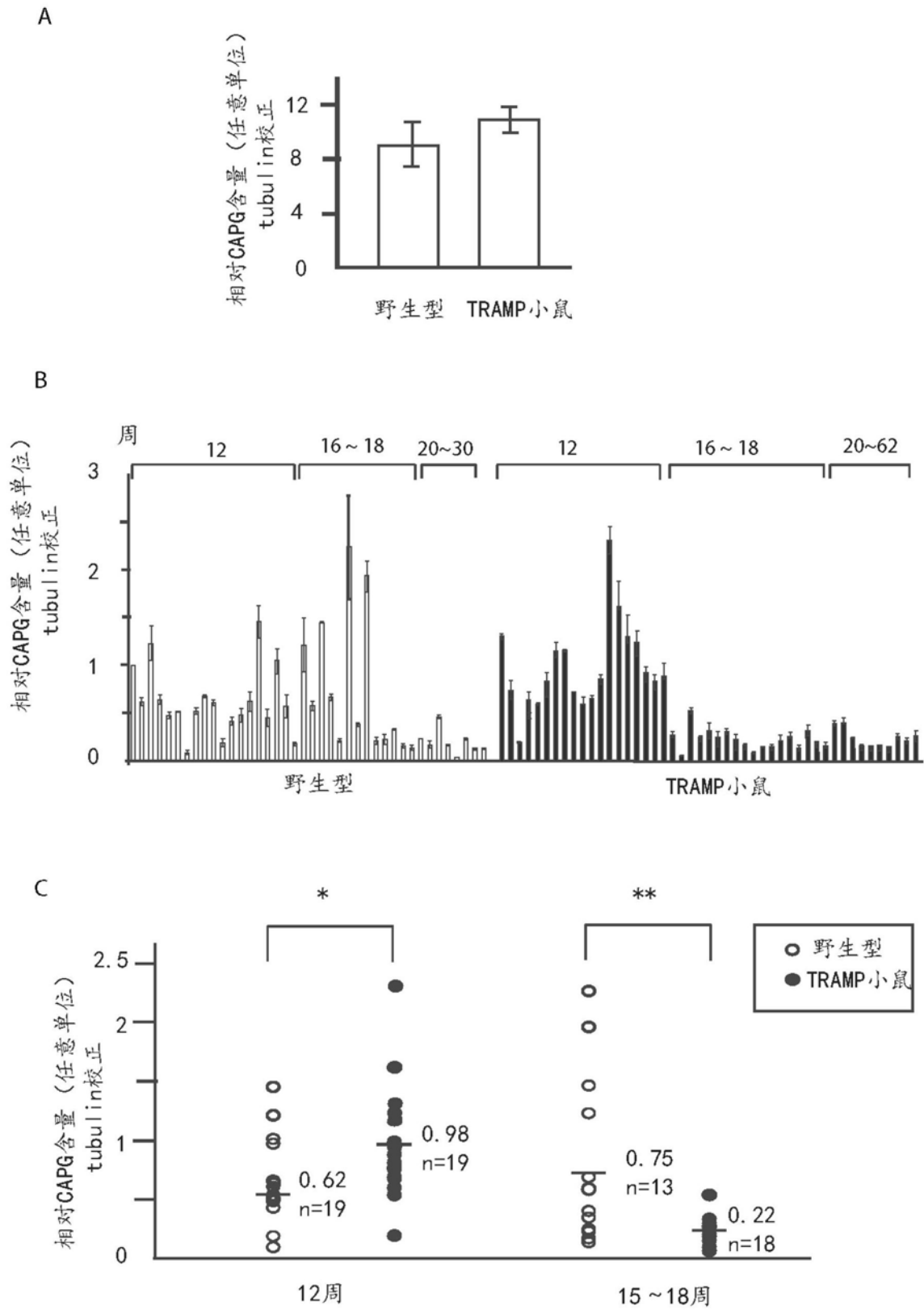


图6

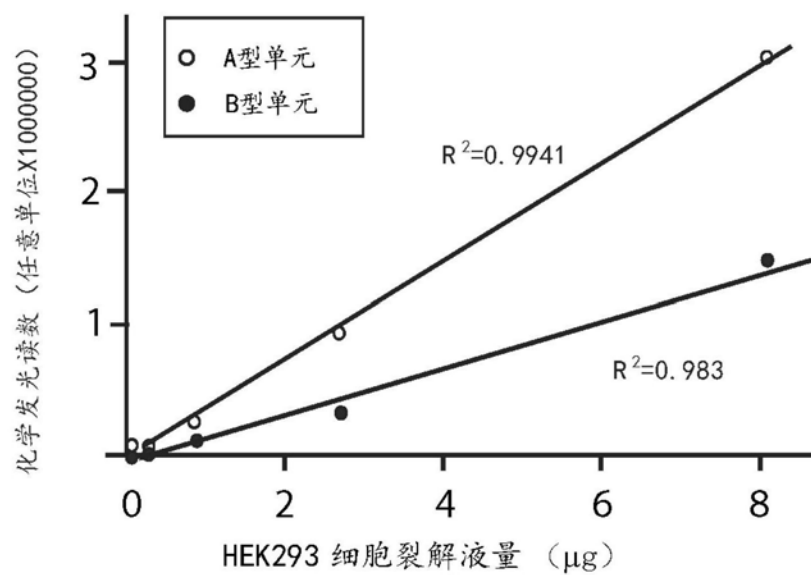
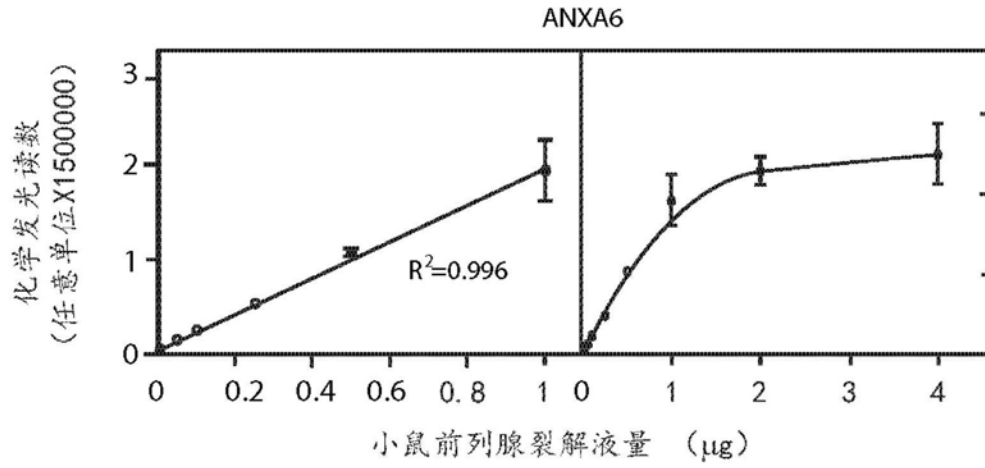
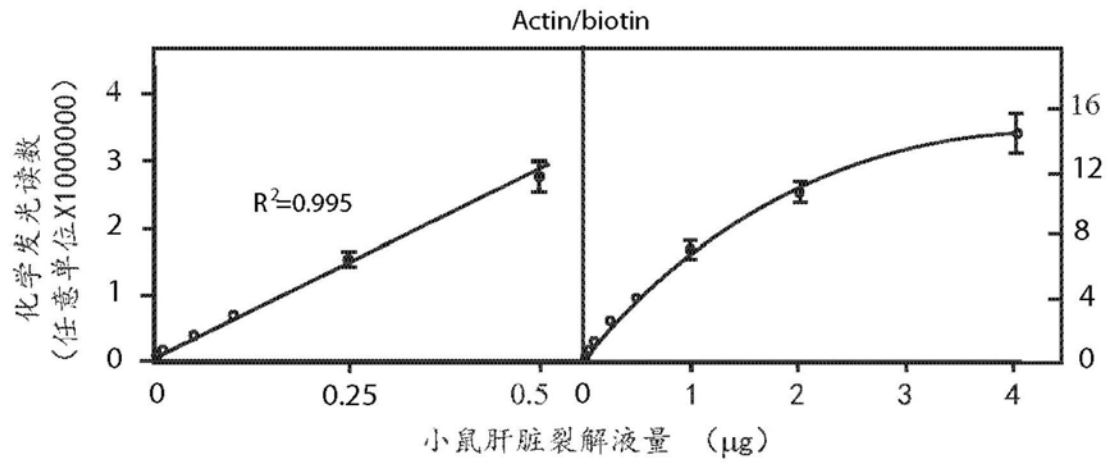


图7

A



B



C

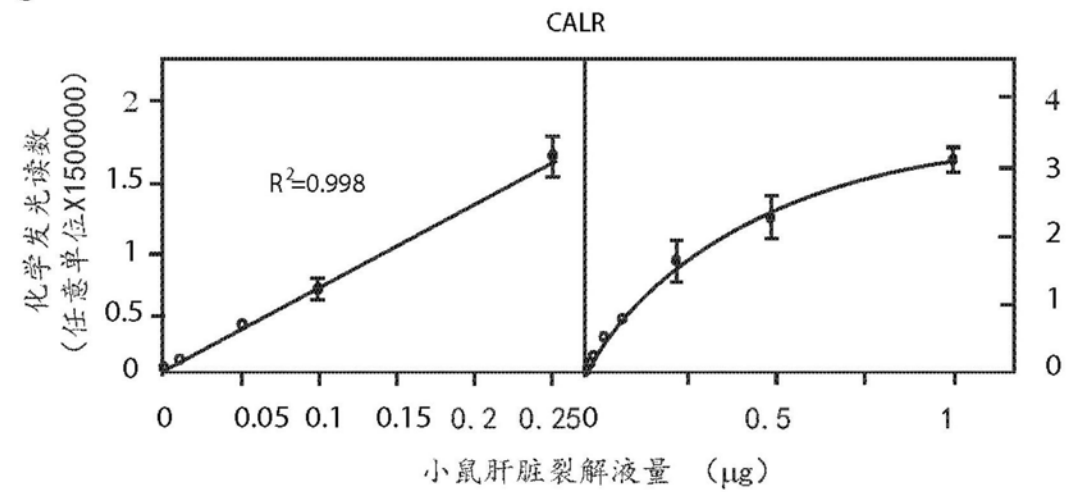


图8

1. 一种表征抗原的方法,其包括:
 - (a) 结合抗原到复数的膜单元上,其中,使每个所述膜单元附着于复数的支承体的一个上;
 - (b) 选择同所述抗原相结合的第一抗体;
 - (c) 将所述第一抗体同所述抗原相结合以形成免疫复合物从而在所述复数的膜单元的每个中具有同其相连接的所述免疫复合物;
 - (d) 使所述免疫复合物发出信号;
 - (e) 检测来自所述复数的膜单元的每个中所形成的所述免疫复合物发出的所述信号的强度;
 - (f) 构建剂量曲线,所述剂量曲线将所述免疫复合物发出的复数的信号强度同所述抗原的复数的量相关联;以及
 - (g) 通过将由所述免疫复合物发出的所述信号强度同所述剂量曲线相匹配以获得所述复数的膜单元的每个中的所述抗原的量。
2. 如权利要求1所述的方法,其中,所述免疫复合物通过选自于由标记酶、放射性同位素、DNA标记物、荧光标记物、电化学标记物及其混合物所构成的组中的标记物来进行标记。
3. 如权利要求2所述的方法,其中,

所述标记酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖氧化酶;并且所述荧光标记物包括藻红蛋白。
4. 如权利要求1所述的方法,其中,所述标记物直接同所述第一抗体相接合或者间接通过针对所述第一抗体的第二抗体相接合。
5. 如权利要求4所述的方法,其中,所述第一抗体或所述第二抗体或两者都预先用标记物进行标记。
6. 如权利要求1所述的方法,其中,所述免疫复合物发出的所述信号为光子或放射物。
7. 如权利要求1所述的方法,其中,从所述复数的膜单元的每个中的所述免疫复合物发出的所述信号是同所述信号的强度相对应的数值。
8. 如权利要求7所述的方法,其中,所述信号的所述强度不是来自于图像转化。
9. 如权利要求1所述的方法,其中,所述复数的支承体的每个通过连接构件来同平面结构相结合,其中所述连接构件包括第一端和第二端,所述第一端结合于所述平面结构,而所述复数的支承体中的一个同所述连接构件的所述第二端相结合,或者通过所述连接构件的所述第一端与所述第二端之间相结合。
10. 如权利要求1所述的方法,其中,所述膜单元是硝酸纤维素膜或PVDF膜,或者是表面覆盖的硝酸纤维素层或PVDF层。
11. 如权利要求6所述的方法,其中,所述光子通过标记物的颜色反应或者标记物的化学发光反应或者标记物的荧光发射来产生。
12. 如权利要求1所述的方法,其中,来自于所述复数的膜单元的每个的所述信号之间互不干扰。
13. 如权利要求1所述的方法,其中,还包括利用步骤(a)至(e)构建剂量曲线。
14. 如权利要求13所述的方法,其中,所述剂量曲线具有所述抗原发出的信号强度同样品量实质上呈线性关系的线性区间。

15. 如权利要求14所述的方法, 其中, 所述样品是含有所述抗原的裂解液或者是所述抗原的标准品。

16. 如权利要求15所述的方法, 其还包括: 测量来自于预定量的所述裂解液中所述抗原的信号强度, 其中, 所述裂解液的所述预定量位于所述裂解液的剂量曲线的所述线性区间。

17. 如权利要求16所述的方法, 其还包括: 将所测量的信号强度同所述抗原的标准剂量曲线的线性区间中的所述抗原的量相关联以获得裂解液中的所述抗原的量。

18. 一种用于免疫印迹分析的方法, 其包括:

利用一种具有相互分离的复数的膜单元的多单元板, 其中, 每个膜单元含有膜;

结合含有抗原的裂解液到所述复数的膜单元的一个或多个上;

选择同抗原相结合的第一抗体;

结合所述第一抗体到所述抗原以形成附着到所述复数的膜单元的一个或多个上的免疫复合物, 其中, 所述第一抗体直接同标记酶相接合, 或者通过一个或多个所述第二抗体间接同标记酶相接合;

从所述膜单元的一个或多个上检测免疫复合物中的所述标记酶发出的光信号。

19. 如权利要求18所述的方法, 其还包括: 获得所述膜单元的一个或多个分别发出的所述信号并将所述信号的强度转化为数值。

20. 如权利要求19所述的方法, 其中, 所述信号的强度并非基于所述信号形成的图像进行测量的。

21. 如权利要求18所述的方法, 其中, 所述膜单元是硝酸纤维素膜或PVDF膜, 或者是基材表面覆盖的硝酸纤维素层或者PVDF层。

22. 如权利要求17所述的方法, 其还包括: 确立所述裂解液的剂量曲线, 其中, 导入所述复数的膜单元的一个或多个中的所述裂解液的量位于所述剂量曲线的线性区间。

专利名称(译)	一种高通量免疫印迹分析的方法和装置		
公开(公告)号	CN110100179A	公开(公告)日	2019-08-06
申请号	CN201880005165.4	申请日	2018-02-13
[标]发明人	张建棣		
发明人	张建棣		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/58 G01N33/60 B01L3/00		
CPC分类号	G01N33/6803		
代理人(译)	洪欣		
优先权	15/433586 2017-02-15 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于包括化学物质、多肽、核酸分子、或者细胞或病毒的原位释放的蛋白质分子的抗原含量的高通量免疫印迹分析的方法和装置。该方法能够提供高度敏感和准确的结果，适用于分析包括细胞和组织裂解液在内的复杂系统。

