



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103037970 A

(43) 申请公布日 2013.04.10

(21) 申请号 201180025292.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.05.20

B01L 3/00(2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006.01)

1008518.1 2010.05.21 GB

G01N 33/543(2006.01)

1100094.0 2011.01.05 GB

G01N 35/00(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012.11.21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/058309 2011.05.20

(87) PCT申请的公布数据

W02011/144758 EN 2011.11.24

(71) 申请人 LAB901 有限公司

地址 英国中洛锡安

(72) 发明人 肯尼思·G·马克拿玛瑞

斯图尔特·保尔沃特 戴维·巴洛

莉迪亚·普列托-劳芬特

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理

有限责任公司 11258

代理人 李剑

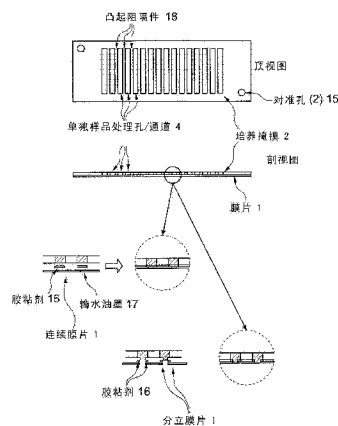
权利要求书 5 页 说明书 9 页 附图 5 页

(54) 发明名称

膜片培育装置

(57) 摘要

一种膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置适于单独培育至少一个膜片的多个区域。



1. 一种膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置适于单独培育至少一个膜片的多个区域。
2. 如权利要求 1 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置包括掩模和至少一个膜片。
3. 如权利要求 1 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置由疏水阻隔件分成多个隔离区域。
4. 如权利要求 2 所述的膜片培育装置,其中,所述隔离区域由所述掩模形成,所述掩模包括凸起阻隔件以形成通道,并且其中,至少一个膜片位于这些通道的每一个通道内。
5. 如权利要求 4 所述的膜片培育装置,其中,所述掩模的这些凸起阻隔件被成型为有助于流体加载到所述通道中的形状。
6. 如权利要求 4 或 5 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片掩模包含围绕这些通道而形成的溢流区域。
7. 如权利要求 4、5 或 6 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置包含接触透明特征,所述接触透明特征在干燥时是不透明的,而在湿润时是透明的。
8. 如权利要求 7 所述的膜片培育装置,其中,当所述特征在润湿后变透明之后,所述特征的下方显现颜色。
9. 如权利要求 4-8 所述的膜片培育装置,其中,由通道形成的所述隔离区域在与所述膜片的界面处与流体密封性可变形密封结合,形成围绕这些通道的流体密封性密封。
10. 如权利要求 9 所述的膜片培育装置,其中,所述流体密封性可变形密封具有介于 25 至 75 Shore A 之间的硬度。
11. 如权利要求 10 所述的膜片培育装置,其中,所述流体密封性可变形密封具有介于 35 至 40Shore A 之间的硬度。
12. 如权利要求 9 至 11 所述的膜片培育装置,其中,所述流体密封性可变形密封是衬垫。
13. 如权利要求 12 所述的膜片培育装置,其中,所述衬垫是 O 形圈。
14. 如权利要求 3 所述的膜片培育装置,其中,所述疏水阻隔件包含胶水和 / 或油墨。
15. 如权利要求 11 所述的膜片培育装置,其中,所述胶水和 / 或油墨通过丝网印刷来涂覆。
16. 如前述权利要求中任意一项所述的膜片培育装置,其中,所述膜片位于膜片支撑表面上。
17. 如前述权利要求中任意一项所述的膜片培育装置,其中,所述膜片支撑表面被分成多个隔离区域。
18. 如权利要求 17 所述的膜片培育装置,其中,这些隔离区域由凸起阻隔件形成,以形成通道。
19. 如权利要求 18 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片被布置在所述掩模的这些通道与所述支撑表面之间。
20. 如权利要求 19 所述的膜片培育装置,其中,由通道形成的这些隔离区域在与所述膜片的界面处与流体密封性可变形密封结合,以形成围绕这些通道的流体密封性密封。
21. 如权利要求 20 所述的膜片培育装置,其中,所述流体密封性可变形密封具有介于

25 至 75Shore A 之间的硬度。

22. 如权利要求 21 所述的膜片培育装置,其中,所述流体密封性可变形密封具有介于 35 至 40Shore A 之间的硬度。

23. 如权利要求 20 至 22 所述的膜片培育装置,其中,所述流体密封性可变形密封是衬垫。

24. 如权利要求 23 所述的膜片培育装置,其中,所述衬垫是 O 形圈。

25. 如权利要求 20 至 24 所述的膜片培育装置,其中,与所述掩模的这些通道和所述支撑表面结合的所述流体密封性可变形密封被布置在所述至少一个膜片的上表面和下表面处。

26. 如权利要求 19 至 25 所述的膜片培育装置,其中,所述掩模和膜片支撑表面通过固定装置固定在一起。

27. 如权利要求 26 所述的膜片培育装置,其中,所述固定装置是紧固夹子、夹紧系统、真空或通过合适的胶粘剂。

28. 如权利要求 27 所述的膜片培育装置,其中,所述固定装置的优选实施方式是紧固夹子。

29. 如前述权利要求中任意一项所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置将所述膜片保持在张力下,以创建平坦和光滑的表面用于所述膜片的进一步处理。

30. 如前述权利要求中任意一项所述的膜片培育装置,其中,所述至少一个膜片被分成多个隔离区域。

31. 如权利要求 30 所述的膜片培育装置,其中,被分成多个隔离区域的所述膜片已经过处理以创建所述膜片的多个流体不可渗透的区域。

32. 如权利要求 31 所述的膜片培育装置,其中,这些隔离区域被所述膜片的流体不可渗透的区域包围,以创建蛋白质转移区域。

33. 如权利要求 32 所述的膜片培育装置,其中,这些蛋白质转移区域被设计成与所述掩模的这些通道精确对齐。

34. 如权利要求 33 所述的膜片培育装置,其中,这些蛋白质转移区域被设计成与所述支撑表面的这些通道精确对齐。

35. 如权利要求 30 至 34 所述的膜片培育装置,其中,所述至少一个膜片被处理,以利用热密封来创建由这些流体不可渗透的区域包围的蛋白质转移区域。

36. 如权利要求 30 至 34 所述的膜片培育装置,其中,所述至少一个膜片被处理,以利用超声波密封来创建由这些流体不可渗透的区域包围的蛋白质转移区域。

37. 如权利要求 30 或 36 所述的膜片培育装置,其中,这些各自分开的蛋白质转移区域和 / 或这些流体不可渗透的区域充当托管标记物,以在对所述至少一个膜片和其中容纳的蛋白质进行成像期间辅助对准过程。

38. 如前述权利要求中任意一项所述的膜片培育装置,其中,所述至少一个膜片培育装置包括对准特征。

39. 如权利要求 38 所述的膜片培育装置,其中,这些对准特征可以包括:所述膜片中的至少一个钻孔、或在辅助标签上打印的并随后施加到所述膜片的至少一个标记物、或直接打印到所述膜片上的至少一个标记物、或通过热、超声波加热或激光而烧到所述膜片上的

至少一个标记物。

40. 如权利要求 38 和 39 所述的膜片培育装置,其中,这些对准特征耐甲醇。

41. 如前述权利要求中任意一项所述的膜片培育装置,其中,所述至少一个膜片培育装置具有条形码,使得该装置是可追溯的。

42. 如权利要求 41 所述的膜片培育装置,其中,所述条形码可以由如下项组成:所述膜片中的至少一个钻孔、或在辅助标签上打印的并随后施加到所述膜片的至少一个条形码、或直接打印到所述膜片上的至少一个条形码、或通过热、超声波加热或激光而烧到所述膜片上的至少一个条形码。

43. 如权利要求 42 所述的膜片培育装置,其中,所述条形码耐在免疫检测中使用的化学品,诸如甲醇。

44. 如权利要求 43 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片掩模和所述支撑表面与用于在使用膜片培育装置时改善培育的设备结合。

45. 如权利要求 44 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片掩模可以是所述培育设备的可拆卸特征。

46. 如权利要求 44 所述的膜片培育装置,其中,所述支撑表面可以是所述培育设备的可拆卸特征。

47. 如权利要求 44 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片掩模可以是所述培育设备的集成特征。

48. 如权利要求 44 所述的膜片培育装置,其中,所述支撑表面可以是所述培育设备的集成特征。

49. 如前述权利要求中任意一项所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置包括用于向所述膜片施加真空的装置。

50. 如权利要求 49 所述的膜片培育装置,其中,用于产生真空的所述装置被用于干燥膜片。

51. 如权利要求 49 或 50 所述的膜片培育装置,其中,施加至多 100kPa 的真空。

52. 如权利要求 49 或 50 所述的膜片培育装置,其中,施加介于 15 和 45kPa 之间的真空。

53. 如权利要求 49 或 52 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置包含用于开关真空的装置。

54. 如权利要求 49 或 52 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置可以包含用于排放所述真空的装置,以释放所述膜片上的压强。

55. 如权利要求 49 或 52 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置包含用于将真空调节到更大或更小程度或均匀分段式或脉冲变化的装置。

56. 如权利要求 44 至 55 所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置包括可拆卸的废物容器。

57. 如前述权利要求任意一项所述的膜片培育装置,其中,所述膜片培育装置包括如下装置:该装置通过机械扩散,诸如混合、涡流/振动、声波、控制所施加的真空拉动溶液通过膜片的速度、在压力下拉动样品来回通过膜片,来改善膜片上的样品的培育。

58. 一种制造膜片的方法,其中,所述膜片被分成多个隔离区域。

59. 如权利要求 58 所述的制造膜片的方法,其中,被分成多个隔离区域的所述膜片已经过处理,以创建所述膜片的流体不可渗透的区域。

60. 如权利要求 59 所述的制造膜片的方法,其中,所述多个隔离区域被所述膜片的流体不可渗透的区域包围,以创建蛋白质转移区域。

61. 如权利要求 60 所述的制造膜片的方法,其中,这些蛋白质转移区域被设计成与膜片培育装置中的通道的尺寸精确对齐。

62. 如权利要求 58 至 61 所述的制造膜片的方法,其中,所述膜片被处理,以利用热密封来创建由这些流体不可渗透的区域包围的蛋白质转移区域。

63. 如权利要求 62 所述的制造膜片的方法,其中,所述膜片被保持在张力下,被成型为所需尺寸的加热工具被施加到所述膜片上。

64. 如权利要求 63 所述的制造膜片的方法,其中,所述加热工具被用于在如下条件下密封膜片的这些区域:介于 190°C 和 220°C 之间的温度,介于 4 和 12 秒之间的时间,以及 0.5KgF 以上的力。

65. 如权利要求 64 所述的制造膜片的方法,其中,所述加热工具被用于在如下条件下密封膜片的这些区域:205°C 的温度,7 秒的时间,以及 2KgF 的力。

66. 如权利要求 58 至 61 所述的制造膜片的方法,其中,所述膜片被处理,以利用超声波密封来创建由这些流体不可渗透的区域包围的蛋白质转移区域。

67. 如权利要求 66 所述的制造膜片的方法,其中,所述膜片在张力下保持在超声波砧中,具有期望图案的接触表面被压靠所述膜片,并激活超声波脉冲。

68. 如权利要求 67 所述的制造膜片的方法,其中,以 1 秒或更短的时间执行一个或更多个脉冲的超声波脉冲。

69. 如权利要求 62 或 68 所述的制造膜片的方法,其中,所述处理被通过保护层进行。

70. 如权利要求 69 所述的制造膜片的方法,其中,所述处理被通过介于 50 到 200- 之间的纸或聚合物片的保护层来进行。

71. 如权利要求 62 至 70 所述的制造膜片的方法,其中,所述处理可以包括主动加热一些区域,同时主动冷却其它区域。

72. 如权利要求 58 至 71 所述的制造膜片的方法,其中,所述膜片具有额外的对准特征。

73. 如权利要求 72 所述的制造膜片的方法,其中,这些对准特征可以包括:所述膜片中的至少一个钻孔、或在辅助标签上打印的并随后施加到所述膜片的至少一个标记物、或直接打印到所述膜片上的至少一个标记物、或通过热、超声波加热或激光而烧到所述膜片上的至少一个标记物。

74. 如权利要求 72 或 73 所述的制造膜片的方法,其中,所述对准特征耐甲醇。

75. 如权利要求 58 至 74 所述的制造膜片的方法,其中,所述至少一个膜片培育装置具有条形码,使得该设备是可追溯的。

76. 如权利要求 75 所述的制造膜片的方法,其中,所述条形码可以由如下项组成:所述膜片中的至少一个钻孔、或在辅助标签上打印的并随后施加到所述膜片的至少一个条形码、或直接打印到所述膜片上的至少一个条形码、或通过热、超声波加热或激光而烧到所述膜片上的至少一个条形码。

77. 如权利要求 75 至 76 所述的制造膜片的方法,其中,所述条形码耐在免疫检测中使

用的化学品,诸如甲醇。

78. 一种膜片,被所述膜片的、被处理成流体不可渗透的区域分成多个隔离区域。

79. 如权利要求 78 所述的膜片,其中,这些隔离区域被所述膜片的流体不可渗透的区域包围,以创建蛋白质转移区域。

80. 一种试剂盒,包含根据权利要求 1-79 中任意一项所述的膜片培育装置。

81. 一种使用根据权利要求 1-79 中任意一项的膜片培育装置的方法。

82. 参考实施例描述的方法。

83. 一种基本如参考附图所描述的膜片培育装置。

膜片培育装置

[0001] 本申请要求 2010 年 5 月 21 日递交的 GB1008518.1 和 2011 年 1 月 5 日递交的 GB1100094.0 的申请日的优先权,所述在先申请的公开内容通过引用被包含在本文中。

技术领域

[0002] 本专利申请涉及改善的膜片(membrane)和膜片培育(incubation)装置,它们适于 Western 印记分析法。

背景技术

[0003] Western 印记法是劳力密集的实验室分析方法,其被广泛用于生命科学,以确定目标蛋白质是否存在于复杂样品中并且确定目标蛋白质的相对量。短语“目标蛋白质”被用于指代分析方法的使用者希望在复杂样品中确认的蛋白质。蛋白质的相对量被用于测量蛋白质表达的变化(即,上调和下调)。

[0004] 确定是否存在特定的蛋白质通过联系两个变量来实现:蛋白质的分子量和其免疫同一性(假设蛋白质这两个非常不同的方面不可能偶然地共存)。确定特定的蛋白质的相对量通过如下来实现:测量复杂样品中的总蛋白质含量,或测量复杂样品中的“管家”蛋白质的量,然后将其与复杂样品中的目标蛋白质的量比较。术语“管家”蛋白质用于表示细胞的基本功能所涉及的一般性蛋白质,例如 β -肌动蛋白或微管蛋白。

[0005] 标准 western 印记方法利用凝胶电泳(例如十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, SDS-PAGE)分离复杂样品中的蛋白质,然后将经分离的蛋白质电转移到固定膜片(通常由硝基纤维素或聚偏二氟乙烯, PVDF 制成),使得蛋白质保持相同的分离图谱。然后,将该膜片在稀释的蛋白质溶液(例如无脂干奶或牛血清白蛋白(BSA))中培育,以封闭非特异性结合位点,然后与特异性地探测目标蛋白质的初级抗体一起培育。然后,洗涤膜片并与允许检测目标蛋白质的次级抗体一起培育。

[0006] 通常,在一个凝胶电泳过程中分离多个样品,例如将 NuPAGE® 预制凝胶用于 10、12、15、20 或 26 样品,或在 ScreenTape® (可从 Lab901 得到)中,多达 16 个样品可以在单个 ScreenTape® 内在 16 个子容器中运行 16 个样品。培育多个样品中的每一个允许例如用不同类型的抗体或不同水平的抗体浓度单独探测样品中的每一个。但是,分离样品以允许它们被单独地探测目前还要求在将样品彼此分离(例如,通过将单个预制凝胶转移前物或将膜片转移后物剪切成分立的条带)之后,将它们转移到单独的膜片。显然,这是一个麻烦的、不精确的并且耗时的过程。

发明内容

[0007] 因此,需要提供一种适于在一个膜片上单独培育多个样品的装置。

[0008] 根据本发明的实施方式的第一方面,提供被分成多个隔离区域的膜片培育装置。多个隔离区域防止在培育过程中探针的交叉污染,并且允许所需要的培育试剂被单独引入

(例如,通过手工移液或自动化装置)到各个隔离区域。

[0009] 本发明的实施方式的膜片培育装置具有许多优点,例如被分成多个区域的单个膜片培育装置允许使用更小体积的培育试剂。此外,允许用不同类型的抗体或不同水平的抗体浓度培育各个样品允许优化对目标蛋白质的探测。

[0010] 膜片培育装置的经隔离区域可以包括通过切割掩模中的孔隙以形成凸起阻隔件所创建的通道。至少一个膜片可以被粘附到掩模上,以提供根据本发明的实施方式的膜片培育装置。掩模可以由塑料构成,并且可以包括对准特征(feature),使得掩模上的位置可被对应到在凝胶电泳过程使用的容器上的相应对准特征。这些参考特征帮助蛋白质分离的结果和培育结果的比较。掩模可以利用压力,例如紧固夹子、夹具系统、真空,或者通过合适的胶粘剂固定到膜片的表面。

[0011] 本发明的实施方式的膜片培育装置也可通过疏水阻隔件被分成多个隔离区域。疏水阻隔件可以用来代替形成凸起阻隔件的掩模,或者在形成凸起阻隔件的掩模之外,还可以使用疏水阻隔件。疏水阻隔件可以包括胶水和/或油墨,所述胶水和/或油墨可以通过丝网印刷来涂覆,并且可以直接涂覆到至少一个膜片上。当疏水阻隔件被涂覆到膜片上并且该组合与掩模一起使用时,掩模可以利用压力,例如紧固夹子、夹具系统、真空,或者通过合适的胶粘剂(图1)固定到膜片上。并且,疏水阻隔件可以直接涂覆到掩模上,并且该组合可以利用压力,例如紧固夹子、夹具系统、真空,或者通过合适的胶粘剂固定到膜片上。

[0012] 粘附到膜片培育装置的至少一个膜片还可以通过利用膜片的多孔结构的熔融或变形处理膜片,而被分成多个区域。膜片(诸如PVDF)的多个区域可以利用热或超声波密封来处理,以产生蛋白质转移区域。密封处理过程在局部化区域中固化膜片,使得经处理的区域被密封并且流体和生物分子不能穿过经处理的区域。这些流体密封性阻隔防止流体从一个分道流到另一个分道(毛细作用),从而仅仅是未经处理的区域允许流体渗透过膜片。如果流体被施加到未经处理的膜片上,其将从接触点通过膜片的多孔材料扩散,导致样品分道之间的交叉污染。膜片的密封处理通过如下防止了这样的现象:产生多个被流体不可渗透的区域包围的单独的区域,在所述区域中,可以转移蛋白质。因此,蛋白质可以针对电泳凝胶被转移到蛋白质转移区域,并且蛋白质转移区域中的每一个可以被单独处理,而不会有流体渗过膜片从一个样品分道到达其相邻的样品分道。蛋白质转移区域可以被设计成与膜片培育装置的隔离区域精确对齐,不管是由膜片掩模的凸起阻隔件形成的通道还是布置在膜片上的疏水阻隔件。

[0013] 在利用热密封进行膜片处理的情况下,膜片将被保持在张力下,并且将被成型为用于形成隔离区域的加热工具被置于膜片上方。在这样的膜片是PVDF的情况下,合适的条件可以是90°C和220°C之间的温度,4到12秒之间的持续时间,以及0.5KgF以上的力,优选地,热密封工具可以在205°C的温度下、以2KgF的力放置在膜片上7秒时间。

[0014] 在利用超声波密封进行膜片处理的情况下,包含具有预定尺寸的接触区域的声极被布置在膜片上方,所述膜片被夹紧以将其保持在张力下。将膜片保持在张力下可以通过如下来实现:将膜片置于巢(超声波砧)中,所述巢(超声波砧)具有用于将所述膜片保持平坦和张紧的夹持框。具有期望图案的接触表面可以被靠着膜片防止,并且激活超声波脉冲至少一次。在这样的膜片是PVDF的情况下,所述超声波脉冲可以优选地被激活多次,持续小于1秒的时间。在施加超声波脉冲之后,声极可以被停止,并且在将膜片仍保持在张力下

的同时冷却膜片。一旦经处理的膜片已经冷却,就可以拿出膜片进行使用。

[0015] 对于通过热或超声波处理密封膜片的一个特定问题是由于在工具的界面处的局部加热以及在靠近膜片的工具周围的一般性加热所导致的膜片的起皱的风险。通过在焊接之前施加保护层(50至200 μm 的纸片,但是也可以使用聚合物片),可以减小起皱。该保护层用于帮助从膜片释放加热元件,并且将热更均匀地分散到被处理的区域。该工艺还可以包括对一些区域进行主动加热,同时对其它区域进行主动冷却。

[0016] 可以使用的保护层是50至200 μm 的衬纸。同样地,可以使用聚合物片,只要该聚合物片的熔融温度高于PVDF的熔点。但是,超声波密封可以使用任何聚合物,因为理论上,应该在PVDF内的焦点处仅仅生成热,并且应该允许相异材料的结合。

[0017] 在另一实施方式中,至少一个膜片的经处理的区域可以充当托管标记物,以在对膜片和其中容纳的蛋白质成像期间辅助对准过程。

[0018] 在一个实施方式中,与膜片培育装置一起使用的至少一个膜片(无论是经过处理的或未经处理的)可以包含额外的参考标记物,以在对膜片和其中容纳的蛋白质成像期间辅助对准过程。额外的参考标记物的应用可以包括,但不限于,膜片中的钻孔、在辅助标签上打印标记物并随后将其施加到膜片上、将标记物直接打印到膜片上、或使用热、超声波加热或激光将标记物烧到膜片中。

[0019] 在另一实施方式中,与膜片培育装置一起使用的至少一个膜片(无论是经过处理的或未经处理的)可以包含条形码,使得其可以是可追溯的。该条形码优选耐在免疫检测中使用的化学品(诸如甲醇)。条形码的施加可以包括,但不限于,在辅助标签上打印条形码并随后将其施加到膜片上、将条形码直接打印到膜片上、利用可配置的冲孔工具来在膜片中创建可扫描的穿孔或使用热、超声波加热或激光将条形码烧到膜片中。此外,一旦处于膜片上,蛋白质通常比在电泳凝胶内更稳定,因此,包含有条形码的膜片可以被存储,以作为将来的参考。

[0020] 在其中膜片培育装置包含掩模的实施方式中,掩模的隔离区域可以由凸起的阻隔来形成,所述阻隔形成穿过掩模的通道。膜片培育装置可以包括多个膜片,每一个膜片被贴附在由凸起的阻隔形成的一个通道内。凸起的阻隔高度可以被调节,以匹配至少一个膜片和胶粘剂层的总厚度。由凸起的阻隔形成的通道可以被形成为有助于加载流体的形状。通道的形状可以改变,例如为方形、圆形、椭圆形、或者蝌蚪状的平滑倒装形(even reminiscent of tadpoles),使得更宽、更圆的端部形成加料端口,使得将流体流放出到较窄的端部的移液管尖端更容易操作。相邻的孔的形状可以是相反定向的相同形状,以允许大量的分道被并排地布置,并且允许利用标准移液管容易地和精确地加料。

[0021] 在其中膜片培育装置包含具有通道的掩模的另一实施方式中,膜片培育装置还可以包含处于与膜片的界面处的流体密封性可变形密封,例如衬垫。所述流体密封性可变形密封可以被布置来帮助围绕切入到膜片掩模中的通道的边缘形成流体密封性密封。这可以包括被安装到膜片上或安装到培育装置上的密封。在流体密封性可变形密封是衬垫的情况下,衬垫可以形成各种形状,以适配通道的确切尺寸,这样的衬垫的一个实施例包括O形圈。在流体密封性可变形密封是衬垫的情况下,其可以具有介于25和75Shore A之间的硬度,但是更典型地是介于30和50Shore A之间。在优选的实施方式中,衬垫可以具有介于35和40Shore A之间的硬度。

[0022] 在其中膜片培育装置包含流体密封性可变形密封(诸如衬垫)的实施方式中,该流体密封性可变形密封(其具有膜片掩模中的通道的确切尺寸)也可以具有被处理以创建流体不可渗透的区域的至少一个膜片中的蛋白质转移区域的确切尺寸。例如,围绕膜片掩模的通道的流体密封性可变形密封可以位于围绕蛋白质转移区域的已经被处理成流体不可渗透的区域上方。流体密封性可变形密封和膜片的流体不可渗透的区域的组合可以允许分道被单独处理,并防止了分道之间的交叉污染。确保通道、流体密封性可变形密封和膜片的被处理成流体不可渗透的区域的尺寸全部被精确设置将对于形成围绕蛋白质转移区域的流体密封性密封是关键。

[0023] 在其中膜片培育装置包含掩模的另一实施方式中,膜片培育装置还可以包括接触透明特征,其中,该特征在干燥时是不透明的,在湿润时是透明的。附加的要素可以包括在该特征变得透明之后在该特征下的颜色的显现。该特征将帮助使用者容易地确定孔是否已经以及孔是否还没有与流体(即包含抗体的溶液)接触。接触透明特征可以是可重复使用的,从而当其干燥时回到不透明状态。

[0024] 在其中膜片培育装置包含掩模的另一实施方式中,膜片培育装置可以包含溢流区域,使得每一个分道可以单独处理小的体积,或较大的体积可以被用于充溢所有的分道,使得每一个分道培育相同的样品。

[0025] 在其中膜片培育装置包含掩模的实施方式中,膜片可被保持在作为膜片掩模的第一表面和作为用于膜片的支撑表面的第二表面之间。形成第一表面的膜片掩模和作为第二表面的支撑表面可以包含用于将至少一个膜片固定在两个表面之间的装置。该固定装置可以包括,但不限于,紧固夹子或夹持系统。所述固定装置可被用于将膜片在张力下保持在两个表面之间。将膜片在张力下保持在膜片培育装置中产生了平坦和光滑的表面,用于膜片的进一步处理,诸如在 western 印记分析所必需的培育过程期间。

[0026] 在其中膜片被保持在膜片掩模和支撑表面之间的实施方式中,所述支撑表面也可以包含通道。支撑表面的通道可以与膜片掩模中的通道对准。支撑表面的通道还可以包含流体密封性可变形密封。支撑表面的流体密封性可变形密封也可以与膜片掩模的流体密封性可变形密封完全对准。例如,膜片掩模和第二表面都可以包含衬有衬垫的通道,以在所述衬垫被布置在膜片的上下表面上时形成流体密封性密封。此外,支撑表面上的流体密封性可变形密封的尺寸可以是经处理以产生流体不可渗透的区域的至少一个膜片中的蛋白质转移区域的确切尺寸。

[0027] 在其中膜片被布置在膜片掩模和支撑表面之间的实施方式中,包含包围蛋白质转移区域的流体不可渗透区域的经处理的膜片将被布置在流体密封性可变形密封上方,所述流体密封性可变形密封围绕支撑表面的通道。然后,可以将膜片掩模布置在膜片上方,并且膜片掩模的孔隙与蛋白质转移区域对齐,使得当膜片掩模和第二表面被固定时,膜片的上下表面上的流体密封性可变形密封被布置在膜片的经流体密封的区域上,以形成围绕蛋白质转移区域的流体密封性管道。在膜片培育装置的另一实施方式中,膜片掩模和支撑表面与用于在使用膜片培育装置时改善培育的设备结合。在这样的实施方式中,膜片掩模可以是培育装设备的可拆卸特征和 / 或支撑表面可以是培育设备的可拆卸特征。或者,在这样的实施方式中,膜片掩模可以是培育设备的集成特征和 / 或支撑表面可以是培育设备的集成特征。

[0028] 在另一实施方式中, 培育设备还可以包含真空系统, 使得置于膜片掩模的通道中的流体在真空下被抽吸通过膜片。由膜片掩模和支撑表面形成的通道允许夹在它们之间的膜片暴露于至多 100kPa 的负压, 但是优选介于 15 至 45kPa 之间的负压。膜片培育装置还可以包含用于开关真空的装置。并且, 膜片培育装置可以包含用于排放真空的装置, 以释放膜片上的压强。此外, 膜片培育装置可以包含用于将真空调节到更大或更小程度或甚至分段式或脉冲变化的装置。这提供了从膜片去除样品的快速和高效的方法, 同时提高了流体到膜片中的渗透。在另一实施方式中, 用于产生真空的装置也可被用于在完成免疫检测的培育步骤之后并在对膜片成像之前干燥膜片。

[0029] 在另一实施方式中, 培育设备可以包括位于膜片下方的可拆卸废物容器。可拆卸废物容器可以具有把手或其他装置, 以允许操作容器, 使得其可被容易地取出和倒空。

[0030] 在其中膜片培育装置包含掩模的实施方式中, 掩模和 / 或培育设备可以由苯乙烯类树脂、丙烯酸类树脂或聚碳酸酯制成。并且, 在其中高表面能可能导致流体流动问题的区域中 (诸如在侧壁上保留水分), 可以使用较低表面能聚合物 (诸如聚碳酸酯)。进一步的重要考虑是塑料材料必须不吸附 / 结合蛋白质, 即培育溶液中的抗血清。

[0031] 在另一实施方式中, 膜片培育装置可以包括如下的装置: 该装置通过机械扩散, 诸如混合、涡流 / 振动、声波、控制所施加的真空拉动溶液通过膜片的速度、在压力下拉动样品来回通过膜片, 来改善膜片上的样品的培育。例如, 膜片装置的摇动可以允许流体渗透穿过多孔膜片, 增加培育流体 (诸如包含抗体的溶液) 与包埋的蛋白质的接触。图 4 示出了在其中经处理以形成流体不可渗透区域的膜片与膜片培育装置组合使用的实施方式中, 摇动提高扩散以及一级抗体与目标蛋白质或次级抗体与一级抗体接触的机会。

[0032] 本发明的实施方式允许免疫检验的使用被聚焦到较之传统的平板凝胶小得多的面积上, 使得样品体积可以被显著减小, 并且灵敏度被提高。因此, 较之传统的方法, 本发明的实施方式将在时间和成本上都是更高效的。

[0033] 本发明的实施方式的膜片培育装置可以容易地被制造成与例如 Millipore SNAP i. d. [®] 装置 (用于培育) 以及 Lab901 TapeStation[®] (用于印记后和 / 或转移后成像) 兼容。

[0034] 在实施方式中, 提供如下的膜片装置, 所述膜片装置被分成多个隔离区域。

[0035] 示例性实施方式的详细说明

[0036] 为了更充分理解本发明的实施方式的目的的特性, 将参考下面的附图, 在附图中, 相同的标号被用于指示相同或相似的部件, 其中:

[0037] 图 1 示出了与膜片接触的膜片培育装置的一个实施方式。

[0038] 图 2 示出了膜片培育装置的第二实施方式, 其中膜片培育装置形成培育设备的一部分。

[0039] 图 3 示出了作为培育设备的一部分的经组装的膜片培育装置。

[0040] 图 4 示出了利用没有摇动的 Snap id 系统、没有摇动的 Lab901 系统以及具有摇动的 Lab901 系统, 由摇动提供的改善的对比分析。

[0041] 图 5 示出了布置在膜片上的具有 14 个分道的 NuPage[®] Midi 凝胶, 所述膜片已经被剪切来适配与 NuPage[®] 凝胶 (8×13cm) 相同的尺寸并已经进行了处理, 以形成由流

体不可渗透的区域包围的蛋白质转移区域。

[0042] 图 1 示出了布置在膜片 1 上的膜片掩模 2。配准掩模 2 包含配准孔 15。在本发明的一个实施方式中,膜片掩模 2 被布置在连续的膜片 1 上,并利用胶粘剂 16 粘附到膜片上。利用疏水油墨 17 将连续膜片 1 分成多个分立的部分。疏水油墨 17 的目的是在膜片 1 的不同部分之间创建液体密封性阻隔。膜片掩模 2 的通道 4 装配在连续膜片的含有蛋白质的部分上方,并且凸起的阻隔 18 位于片膜片 1 的由疏水油墨 17 封闭的部分上方。在本发明的另一实施方式中,膜片掩模 2 被布置在膜片 1 的分立的部分上方,其中,膜片掩模 2 的通道 4 被布置在膜片 1 上方,膜片 1 由胶粘剂 16 保持在适当位置上。

[0043] 图 2 示出了由膜片 1 构成的培育设备 5,所述膜片 1 被精确地布置到可拆卸膜片支撑体 3 上(使得膜片上的转移的蛋白质与孔精确对齐)。可拆卸膜片支撑体 3 包含通道 4,所述通道 4 的边缘围绕有衬垫 10。可拆卸膜片支撑体 3 布置到培育设备 5 的凹部中,所述凹部位于可拆卸废物容器上方,所述可拆卸废物容器位于充液室 6 下方,所述充液室 6 收集废物并且将其下漏至废物容器,所述废物容器从培育设备 5 延伸出。膜片掩模 2 通过铰链 8 附接到培育设备 5,所述膜片掩模 2 可以利用铰链 8 下降到膜片 1 上方。当膜片掩模 2 被转到膜片 1 上方时,支撑表面通过支撑表面固定装置 9 被固定就位。膜片掩模 2 利用紧固夹子 7 锁定在适当位置上。膜片掩模 2 包含通道 4,所述通道 4 与膜片支撑表面 3 中的通道 4 精确对齐。紧固夹子 7 可利用释放把手 13 打开,以允许在使用之后取出膜片 1、膜片掩模 2 和膜片支撑表面 3。

[0044] 图 3 示出了处于关闭位置的膜片培育设备,其中,膜片掩模 2 利用紧固夹子 7 紧固到膜片 1 上方的适当位置。膜片掩模 2 的上部示出了形成凸起的阻隔 18 的通道 4,并且所述通道 4 被成型,以形成用于易于向通道 4 加料的加料端口 11 以及用于将大量的流体一次添加到所有通道 4 的围绕所述通道 4 的溢流区域 14。紧固夹子 7 可利用释放把手 13 打开,以允许在使用之后取出膜片 1、膜片掩模 2 和膜片支撑表面 3。

[0045] 图 5 示出了布置在膜片 42 上的具有 14 个分道的 NuPage® Midi 凝胶 41,所述膜片 42 已经被剪切来适配与 NuPage® 凝胶 (8×13cm) 相同的尺寸并已经进行了处理,以形成由流体不可渗透的区域包围的蛋白质转移区域 44。蛋白质转移区域 44 的热熔图案与 NuPage® Midi 凝胶的 14 个分道精确对应。膜片被布置到膜片载体 43 上。

[0046] 实施例 1

[0047] 包含多个单独的蛋白质转移区域的膜片可以通过如下来制造:

[0048] a) 将用保护材料(通常为衬纸或聚合物片,厚度在 50 到 200 μm 之间)覆盖的 PVFD 膜片的多个部分置于超声波砧中。

[0049] b) 利用夹具将膜片固定在超声波砧中,以将膜片保持在张力下。

[0050] c) 将声极压靠保护层覆盖物,所述声极在接触表面上具有经加工的凸起特征,以聚集超声波振动。

[0051] d) 激活超声波脉冲,以在声极接触表面的凸起聚集特征处局部密封膜片。

[0052] e) 冷却膜片,并移走声极。

[0053] 实施例 2

[0054] 使用膜片培育装置作为利用 LAB901 Western 印记设备的 Western 印记分析的一部

分

[0055] 凝胶电泳

[0056] 包含蛋白质的样品按如下来制备：

[0057] a. 将 2 μ l 蛋白质样品与 2 μ l 荧光染料在 75° C 下培育 7 分钟；

[0058] b. 添加 4 μ l 的加料缓冲液，混合并在 75° C 下再培育 5 分钟；以及

[0059] c. 添加 2 μ l 分道标记物。

[0060] 将样品加载到 Lab901P200 **ScreenTape®** 电泳凝胶上，并根据制造商的标准规程运行，以分离蛋白质。利用 Lab901 **TapeStation®** 对用过的 **ScreenTape®** 成像。

[0061] 将经分离的样品转移到膜片上

[0062] 从 **TapeStation®** 回收包含经分离的蛋白质的用过的 **ScreenTape®**，去除其载体层，并且用两个刀片切掉 **ScreenTape®** 的顶部和底部，暴露容纳在 16 个子容器内的凝胶柱的顶部和底部。使用包含 16 个凝胶推挤元件的梳子推挤各个子容器内的凝胶，使得凝胶被提出到已经在 tris-甘氨酸 20% 甲醇转移缓冲液中浸泡的 PVDF 膜片上。通过 PVDF 膜片的预先的热处理产生具有多个单独的蛋白质转移区域的膜片。膜片被置于印记纸片的顶部，所述印记纸也已经在 tris-甘氨酸 20% 甲醇转移缓冲液中浸泡，所述印记纸和膜片都被支撑在阳极板上。已经在 tris-甘氨酸 20% 甲醇转移缓冲液中浸泡的第二印记纸片被布置在阴极板上，并且将阴极板闭合到阳极板上，并且蛋白质在 50V/cm 的电压下转移 10 分钟。将印记纸和凝胶从膜片去除。凝胶保持与转移后的并从膜片整齐地揭起的印记纸相联。

[0063] 质量控制步骤

[0064] 转移后，利用 Lab901 **TapeStation®** 对膜片成像。利用托管标记物和对准特征，将在电泳之后记录的总蛋白质图像叠加到转移到膜片上的总蛋白质的图像上。然后，将进行免疫检测过程之前，评估转移过程的效率。在此分析之后，将膜片转移到抗体培育装置。

[0065] 探测经分离和转移的样品

[0066] 膜片上的经分离的蛋白质按如下被转移到培育设备：

[0067] a) 由被流体不可渗透的区域包围的多个单独的蛋白质转移区域组成的膜片被重新置于包含通道的支撑表面，所述通道具有与单独的蛋白质转移区域的精确尺寸一样的大小；

[0068] b) 将膜片布置到支撑表面上，从而实现完全对齐；

[0069] c) 将支撑表面布置到处于可拆卸的废物容器的顶部的培育设备中；

[0070] d) 然后，利用装配在支撑表面上方的上掩模固定膜片，所述掩模包含具有与单独的蛋白质转移区域的精确尺寸一样大小的通道；

[0071] e) 然后将真空源连接到培育设备。

[0072] 然后使用免疫检测按如下来探测膜片：

[0073] a. 使用在磷酸盐缓冲的盐水 Tween (PBST) 中的 0.05% 无脂干奶 (NFDM) 封闭非特异性结合位点，并通过真空抽吸去除；

[0074] b. 初级抗体培育：1:1000 浓度的抗-溶解酵素并培育 10 分钟，并通过真空抽吸去除；

- [0075] c. 用 PBST 洗涤 3 次, 并通过真空抽吸去除;
- [0076] d. 次级抗体培育: 以 1:10,000 的浓度涂布抗 - 兔 IgG-Alexa488 并且培育 10 分钟, 并通过真空抽吸去除;
- [0077] e. 用 PBST 洗涤 3 次, 并通过真空抽吸去除;
- [0078] f. 对膜片施加真空, 直至其干燥;
- [0079] f. 从培育设备取出膜片; 以及
- [0080] g. 在 **TapeStation®** 上成像。
- [0081] 使用用于 Lab901 软件的 **GeneTools®**, 利用经热处理的 PVDF 膜片和 **ScreenTape®** 上存在的对准特征和托管标记物叠加电泳后的经分离的蛋白质的图线、转移后的经分离的蛋白质的图线以及被探测的蛋白质的图线。
- [0082] 实施例 3
- [0083] 将膜片培育装置用于蛋白质的免疫检测, 所述蛋白质通过利用采用 Invitrogen™ **NuPAGE®** 12 道电泳凝胶分离的蛋白质的电泳进行了分离。
- [0084] a) 利用 **NuPAGE®** 凝胶系统的电泳后, 膜片被用于蛋白质转移过程, 所述膜片采用热或超声波密封进行处理, 以形成 12 道的蛋白质转移区域, 所述 12 道的蛋白质转移区域严格对应于 **NuPAGE®** 电泳凝胶的 12 个道的尺寸 (参见图 5);
- [0085] b) 在转移后, 将转移设备分解, 并且由被流体不可渗透的区域包围的多个单独的蛋白质转移区域构成的膜片被重新置于包含通道的支撑表面, 所述通道具有与单独的蛋白质转移区域的精确尺寸一样的大小;
- [0086] c) 将膜片布置到支撑表面上, 从而实现完全对齐;
- [0087] d) 将支撑表面布置到处于可拆卸的废物容器的顶部的培育设备中;
- [0088] e) 然后, 利用装配在支撑表面上方的上掩模固定膜片, 所述掩模包含具有与单独的蛋白质转移区域的精确尺寸一样大小的通道;
- [0089] f) 然后将真空源连接到培育设备。
- [0090] 然后使用免疫检测按如下来探测膜片:
- [0091] a. 使用在磷酸盐缓冲的盐水 Tween (PBST) 中的 0.05% 无脂干奶 (NFDM) 封闭非特异性结合位点, 并通过真空抽吸去除;
- [0092] b. 初级抗体培育: 1:1000 浓度的抗 - 溶解酵素并培育 10 分钟, 并通过真空抽吸去除;
- [0093] c. 用 PBST 洗涤 3 次, 并通过真空抽吸去除;
- [0094] d. 次级抗体培育: 以 1:10,000 的浓度涂布抗 - 兔 IgG-Alexa488 并且培育 10 分钟, 并通过真空抽吸去除;
- [0095] e. 用 PBST 洗涤 3 次, 并通过真空抽吸去除;
- [0096] f. 对膜片施加真空, 直至其干燥;
- [0097] f. 从培育设备取出膜片; 以及
- [0098] g. 在 **TapeStation®** 上成像。

[0099] 使用用于 Lab901 软件的 GeneTools[®]，利用经热处理的 PVDF 膜片和 ScreenTape[®] 上存在的对准特征和托管标记物叠加电泳后的经分离的蛋白质的图线、转移后的经分离的蛋白质的图线以及被探测的蛋白质的图线。

[0100] 应该注意，术语“包含”不排除其它要素或步骤，并且冠词“一”不排除多个。并且，结合不同的实施方式描述的要素可以组合。还应该注意，权利要求书中的标号不应被解释为对权利要求范围的限制。

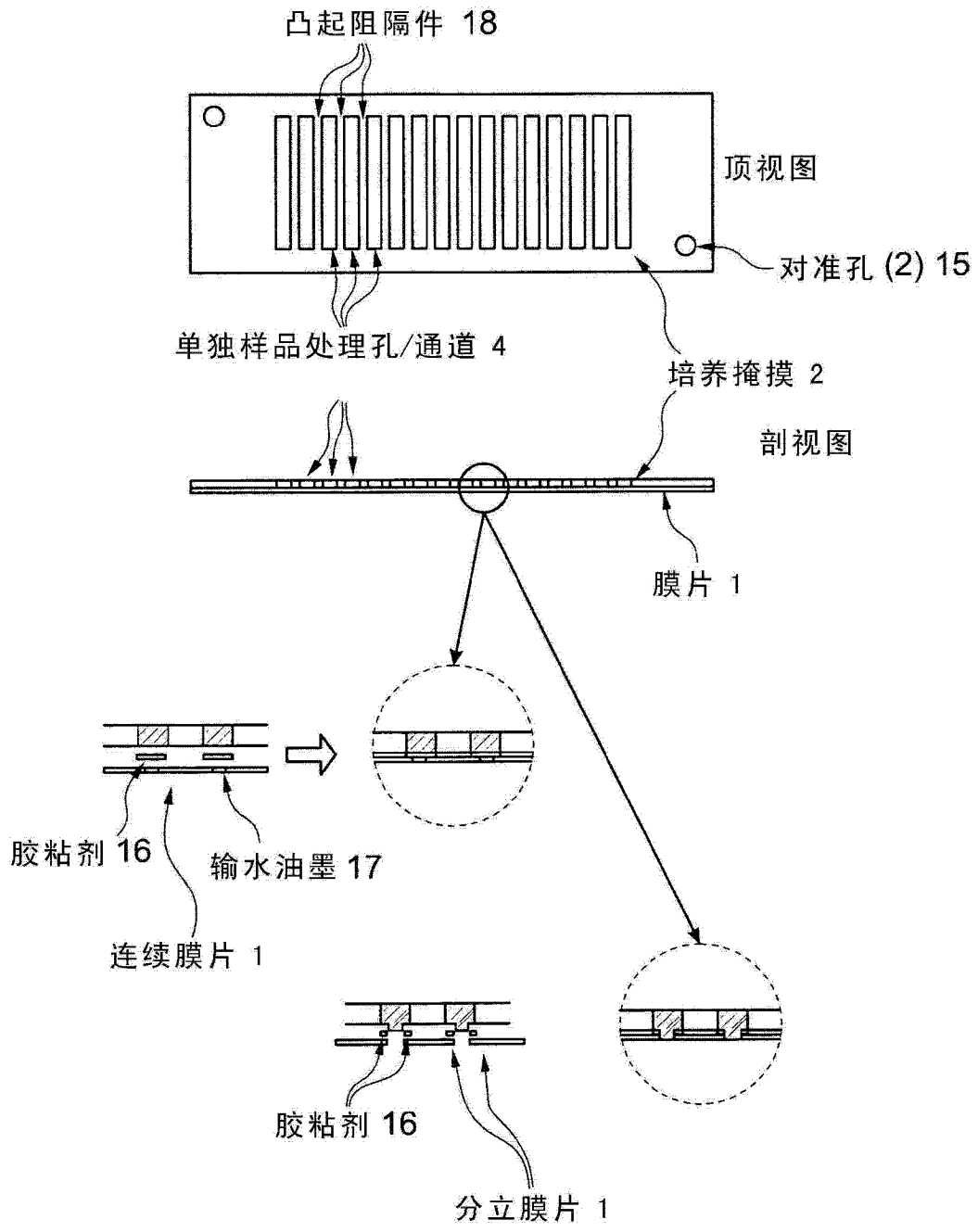


图 1

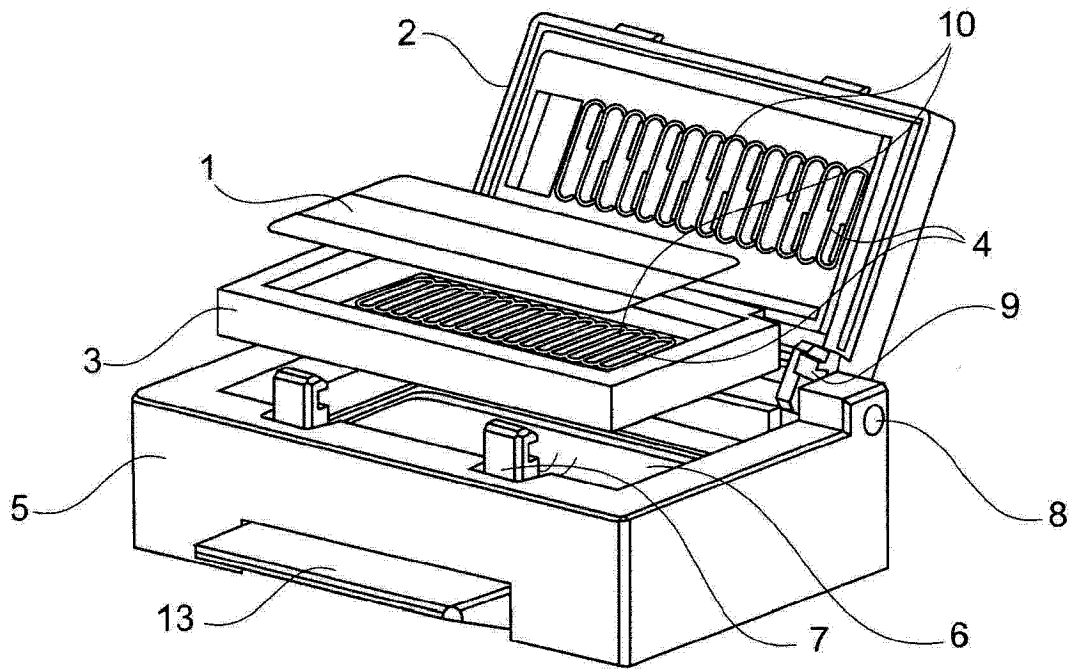


图 2

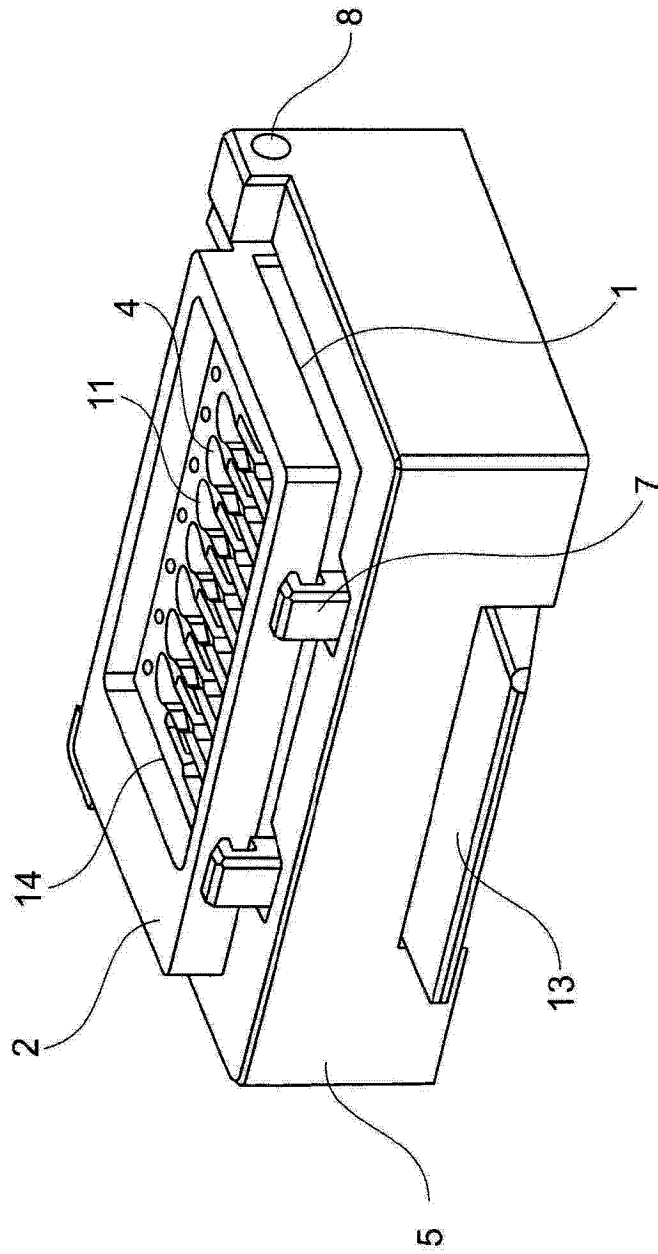


图 3

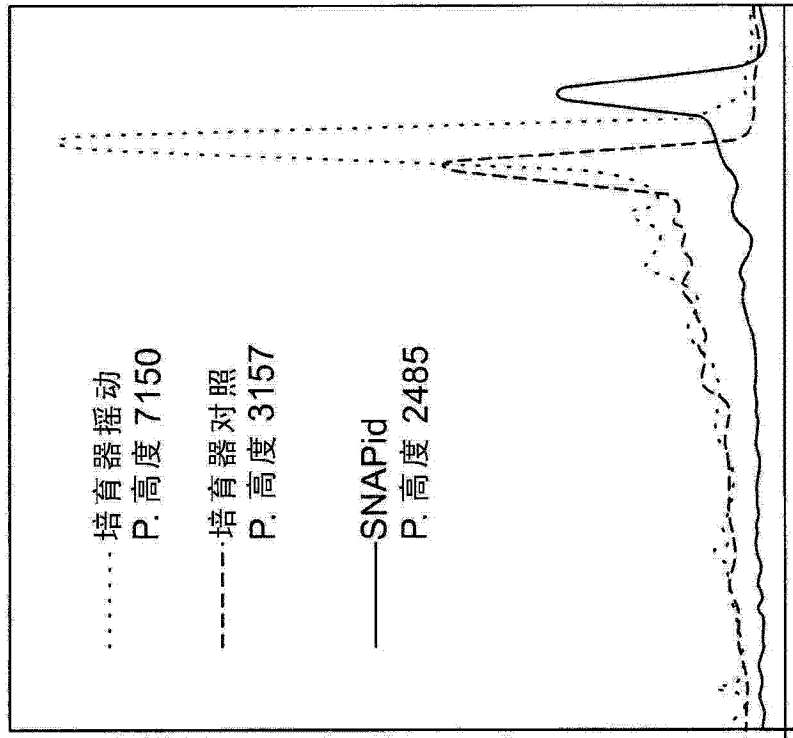


图 4

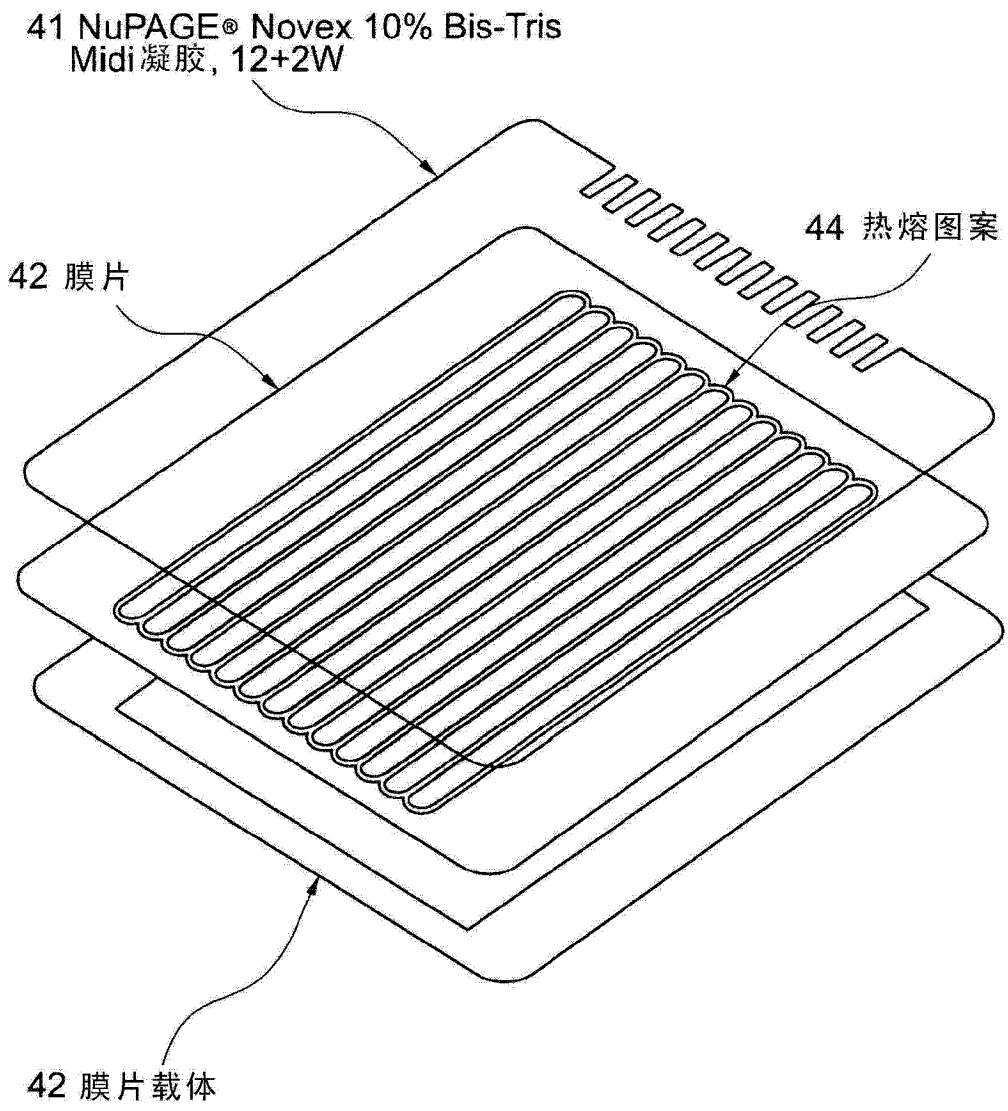


图 5

专利名称(译)	膜片培育装置		
公开(公告)号	CN103037970A	公开(公告)日	2013-04-10
申请号	CN201180025292.9	申请日	2011-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	LAB901有限公司		
申请(专利权)人(译)	LAB901有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	LAB901有限公司		
[标]发明人	肯尼思G马克拿玛瑞 斯图尔特保尔沃特 戴维巴洛 莉迪亚普列托劳芬特		
发明人	肯尼思·G·马克拿玛瑞 斯图尔特·保尔沃特 戴维·巴洛 莉迪亚·普列托·劳芬特		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N35/00		
CPC分类号	B01L3/50857 B01L2300/0816 B01L2300/0825 B01L2300/089 B01L2300/165 Y10T29/49 Y10T156/10 B32B37/06		
代理人(译)	李剑		
优先权	2010008518 2010-05-21 GB 2011000094 2011-01-05 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种膜片培育装置，其中，所述膜片培育装置适于单独培育至少一个膜片的多个区域。

