



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102918387 B

(45)授权公告日 2017.05.24

(21)申请号 201180025296.7
(22)申请日 2011.05.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102918387 A

(51)Int.Cl.
G01N 27/447(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
G01N 1/04(2006.01)

(43)申请公布日 2013.02.06
(30)优先权数据
1008517.3 2010.05.21 GB
1100092.4 2011.01.05 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.11.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2011/058306 2011.05.20

(56)对比文件
US 2010/0120171 A1,2010.05.13,
US 2005/0277185 A1,2005.12.15,
US 5238651 A,1993.08.24,
JENNIFERL. HOLMES et al.Determination
of Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear
Translocator Protein Concentration and
Subcellular Localization in Hepatic and
Nonhepatic Cell Culture Lines:
Development of Quantitative Western
Blotting Protocols for Calculation of
Aryl Hydrocarbon Recep.《MOLECULAR
PHARMACOLOGY》.1997,第52卷(第2期), (续)

(87)PCT国际申请的公布数据
W02011/144755 EN 2011.11.24
(73)专利权人 安捷伦科技有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 肯尼思·G·马克拿玛瑞
斯图尔特·保尔沃特
(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

审查员 黎作佳

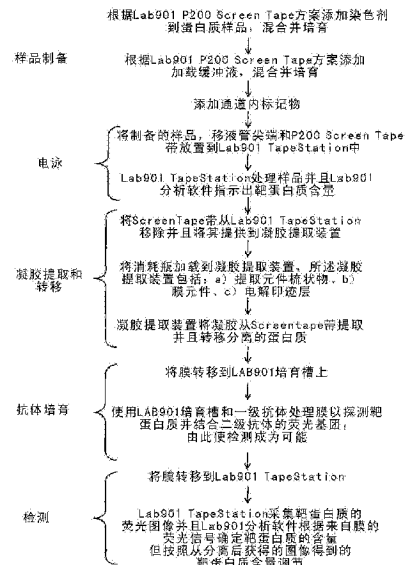
代理人 李晓冬

权利要求书4页 说明书12页 附图8页

(54)发明名称
western印迹分析技术

(57)摘要

本发明涉及western印迹分析技术。根据本发明的实施例,本发明提供了进行western印迹分析的方法,所述方法包括依次执行下述步骤:
a).预染色样品中的蛋白质;b).使用凝胶电泳分离蛋白质;c).分析分离的蛋白质以确定总蛋白质含量和/或至少一个持家蛋白质含量;d).将蛋白质转移到至少一个膜上;e).探测分离的蛋白质以检测靶蛋白质;f).分析探测的蛋白质以确定靶蛋白质的分子量和/或靶蛋白质的含量。



CN 102918387 B

[接上页]

(56)对比文件

Hubert Chassaigne, et al.Resolution and identification of major peanut allergens using a combination of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis,Western blotting and Q-TOF mass spectrometry.《Journal of

Proteomics》.2009,第72卷(第3期),

Hubert Chassaigne, et al.Resolution and identification of major peanut allergens using a combination of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis,Western blotting and Q-TOF mass spectrometry.《Journal of Proteomics》.2009,第72卷(第3期),

1. 一种进行Western印迹分析技术的方法,其中,所述方法按以下顺序执行:

- a). 预染色样品中的蛋白质;
- b). 使用凝胶电泳分离所述蛋白质;
- c). 分析所分离的蛋白质以确定总蛋白质含量和/或至少一个持家蛋白质含量;
- d). 将所述蛋白质转移到至少一个膜上;
- e). 探测所分离的蛋白质以检测靶蛋白质;以及
- f). 分析所探测的蛋白质以确定所述靶蛋白质的含量或者分子量和含量,

其中,将所述总蛋白质含量和/或持家蛋白质含量与所述靶蛋白质含量比较,以获得总蛋白质和/或持家蛋白质含量相对靶蛋白质含量的比率。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述蛋白质含量被计算为相对于电泳凝胶中的荧光的位置而绘制或相对于从蛋白质分离开始的固定点处检测到所述荧光的时间而绘制的荧光强度曲线下方的面积。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述总蛋白质含量被确定为相对于电泳凝胶中的荧光的位置而绘制或相对于从蛋白质分离开始的固定点处检测到所述荧光的时间绘制的荧光强度曲线下方的全部面积。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述靶蛋白质含量和/或持家蛋白质含量被确定为在相对于电泳凝胶中的荧光的位置而绘制或相对于从蛋白质分离开始的固定点处检测到所述荧光的时间而绘制的荧光强度曲线上的特定峰值下的面积。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,靶蛋白质的浓度是用下述方式计算的:使用已知蛋白质浓度的含量来建立校准曲线,并将所述靶蛋白质含量绘图到所述校准曲线上。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,执行所述靶蛋白质的系列稀释以提高确定靶蛋白质浓度的计算的精确度。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述总蛋白质含量和/或持家蛋白质含量用作含量对照。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,将所述总蛋白质含量和/或持家蛋白质含量用作含量对照,并使用这些数值来归一化所述总蛋白质含量和/或持家蛋白质含量相对于靶蛋白质含量的比率。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中,使用至少一个荧光基团将所述样品中的所述蛋白质预染色。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中,使用多于一个荧光基团,各荧光基团在不同波长处激发和发射,使得在分析期间可单独地识别各荧光基团。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述总蛋白质和/或持家蛋白质与荧光基团相关,所述靶蛋白质与下述荧光基团相关:该荧光基团相对于与所述总蛋白质和/或持家蛋白质相关的荧光基团而言在不同波长处激发和发射。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中,分析所分离的蛋白质以确定总蛋白质含量的步骤包括:捕获所分离的蛋白质的图像。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中,分析所探测的蛋白质以确定靶蛋白质含量的步骤包括:捕获所探测的蛋白质的图像。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中,分析所分离的蛋白质以确定所述总蛋白质含量

和/或持家蛋白质含量和/或分析所探测的蛋白质以确定所述靶蛋白质含量的步骤包括：使用软件分析技术来处理分析数据。

15. 根据权利要求1所述的方法，其中，分析所分离的蛋白质以确定所述总蛋白质含量和/或持家蛋白质含量以及分析所探测的蛋白质以确定所述靶蛋白质含量的步骤是在单个分析设备上执行的。

16. 根据权利要求1所述的方法，其中，使用可编程的计算机来控制凝胶电泳期间使用的电压和时间。

17. 根据权利要求1所述的方法，其中，在步骤b) 期间添加通道标记物，来帮助绘制所分离的蛋白质的分析结果和所探测的蛋白质的分析结果。

18. 根据权利要求1所述的方法，其中，使用分子量定径标记物来帮助绘制所分离的蛋白质的分析结果和所探测的蛋白质的分析结果。

19. 根据权利要求1所述的方法，其中，分析所分离的蛋白质以确定所述总蛋白质含量和/或持家蛋白质含量和/或分析所探测的蛋白质以确定所述靶蛋白质含量的步骤包括：通过参考存储的信息来辨识所述样品。

20. 根据权利要求1所述的方法，其中，使用可编程计算机来控制将所分离的蛋白质转移到至少一个膜上的过程中使用的电压和时间。

21. 根据权利要求1所述的方法，其中，所述方法包括：捕获所述电泳凝胶后转移的图像，作为蛋白质转移的效率的质量控制步骤。

22. 根据权利要求1所述的方法，其中，所述方法包括：在所分离的蛋白质已被转移至所述至少一个膜上之后，捕获所述所分离的蛋白质的图像。

23. 根据权利要求1所述的方法，其中，通过包括下述项的方式来优化转移方法以防止或减轻渗漏：改变转移缓冲液的pH、缓冲液的类型、使用不连续缓冲液，即，在正极和负极印迹纸中使用不同的缓冲液以及在所述膜中使用不同的缓冲液，或通过改变整个凝胶上每厘米的电压。

24. 根据权利要求1所述的方法，其中，通过提取措施相对于容器移动所述凝胶，来从所述容器中提取分子分离凝胶。

25. 根据权利要求24所述的方法，其中，所述提取措施适于相对于所述容器移动所述凝胶，同时保持所述凝胶的纵横比。

26. 根据权利要求24所述的方法，其中，所述提取措施适于通过推挤所述凝胶来相对于所述容器移动所述凝胶。

27. 根据权利要求26所述的方法，其中，所述提取措施包括多个凝胶推挤元件，所述多个凝胶推挤元件作用于多个凝胶子容器上。

28. 根据权利要求27所述的方法，其中，所述凝胶推挤元件形成梳状物。

29. 根据权利要求27所述的方法，其中，所述凝胶推挤元件被引导到位。

30. 根据权利要求27所述的方法，其中，与所述凝胶的表面接触的各凝胶推挤元件的部件的形状和尺寸基本上对应于所述凝胶推挤元件与所述凝胶之间的界面的横截面积，使得整个凝胶从所述容器移位，同时保持所述凝胶的纵横比。

31. 根据权利要求27所述的方法，其中，所述凝胶推挤元件是弹性可变形的，以允许容忍所述子容器的内部的形状和尺寸以及所述凝胶推挤元件与所述容器在对齐方面的小变

化。

32. 根据权利要求27所述的方法,其中,所述凝胶子容器受到物理操作来帮助所述凝胶的提取。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中,所述物理操作包括以下至少一项:旋转所述凝胶子容器、轻轻地施加压力、按压所述凝胶子容器。

34. 根据权利要求27所述的方法,其中,所述凝胶子容器可包括用于与支撑体的对准特征相结合的对准特征,以与它们在电泳容器内的初始定位相关地确定凝胶部分的位置。

35. 根据权利要求1所述的方法,其中,e). 探测所分离的蛋白质以检测靶蛋白质是在培育设备中进行的。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中,所述培育设备能够单独地培育至少一个膜的部分。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中,所述培育设备包括掩模和至少一个膜,其中,所述掩模中的小孔形成分离的部分。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中,所述分离的部分由所述掩模形成,所述掩模包括凸起的屏障,至少一个膜位于各个分离的部分内。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中,在所述分离的部分周围形成溢流区域。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中,所述分离的部分包括流体密封性可变形的密封件,所述流体密封性可变形的密封件是在与所述膜的界面处的垫圈,形成在所述分离的部分周围的不漏液密封件。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中,所述培育设备被疏水性屏障分离成分离的部分。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中,所述疏水性屏障包括胶和/或油墨。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述胶和/或油墨通过网版印刷来涂覆。

44. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述至少一个膜被分离成由不透液区域围绕的各个蛋白质转移区域。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中,各个蛋白质转移区域是通过热处理来产生的。

46. 根据权利要求44所述的方法,其中,各个蛋白质转移区域是通过超声焊接来产生的。

47. 根据权利要求44所述的方法,其中e). 探测所分离的蛋白质以检测靶蛋白质是在培育设备中进行的,所述培育设备能够单独地培育至少一个膜的部分,所述培育设备包括掩模和至少一个膜,所述掩模中的小孔形成分离的部分,所述各个蛋白质转移区域被设计为与培育设备的所述分离的部分精确地对准。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中,所述各个蛋白质转移区域和/或所述不透液区域充当可信的标记物,以帮助在所述膜和其内包含的所述蛋白质成像期间的校准操作。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中,条形码被结合到所述膜上,使得能够跟踪所述样品。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中,所述条形码耐受于在免疫检测中使用的化学品。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述化学品包括甲醇。

52. 一种设备,被配置来执行根据权利要求1至51中任一项所述的方法。

western印迹分析技术

[0001] 本申请要求提交于2010年5月21日的GB1008517.3和提交于2011年1月5日的GB1100092.4的提交日期优先权,它们的公开内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0002] 本专利申请涉及进行western印迹分析 (blot analytical) 技术的改良的方法。

背景技术

[0003] Western印迹法是劳动密集型实验室分析方法,其广泛地应用于生命科学中以确定在复杂样品中是否存在靶蛋白质并且以确定靶蛋白质的相对量。所使用的术语“靶蛋白质”是指分析方法的使用者期望在复杂样品内辨识的蛋白质。使用蛋白质的相对数量来测量蛋白质表达中的变化(即,上调和下调)。

[0004] 通过结合下述两个变量来实现确定是否存在特定蛋白质:蛋白质的分子量及其免疫特性(假定蛋白质的这两个极为不同的方面不可能偶然共存)。通过下述方式来实现确定特定蛋白质的相对数量:将复杂样品中的靶蛋白质与总蛋白质元素或常见的“持家(housekeeping)”蛋白质的数量比较。所用术语“持家”蛋白质是指涉及细胞基本功能的常见蛋白质,例如,肌动蛋白或微管蛋白。在western印迹分析中量化总蛋白质或“持家”蛋白质的第二功能是它们可被用作为加载对照。可使用总蛋白质或“持家”蛋白质存在的数量来辨识通道(lane)加载中和样品制备中的不准确性。然后,使用这些差异来归一化靶蛋白质数值,从而把这些不准确性考虑进去。

[0005] 标准western印迹方法使用电泳(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,将分离的蛋白质电转移到固体膜(通常,由硝化纤维或聚偏二氟乙烯制成,PVDF)使得蛋白质保持同样的分离模式。然后,将此膜在稀释的蛋白质溶液(如,脱脂奶粉或牛血清白蛋白(BSA))中培育,以阻断非特异性键合部位,然后使用一级抗体(即,特别用于靶蛋白质)培育,使用允许用于靶蛋白质检测的二级抗体洗和培育。这称作免疫检测。一旦用户已经确定所述样品中是否存在靶蛋白质,就将第一和第二抗体就从所述膜剥离,并且所述膜使用替代第一抗体(特别用于可用作为加载对照的另一个蛋白质)来培育,使用允许用于加载对照的检测的第二抗体来洗和培育。

[0006] 通常,整个方法完成需5至8小时,尽管一些使用者喜欢将整个方法中的一些步骤过夜运行。

[0007] 关于标准western印迹方法的问题包括下述事实:通常,电泳之后分离的蛋白质样品不可见,因此使用者不能容易地分析蛋白质分离的结果。可在分离之后将分离的蛋白质样品染色以使得使用者可完全可见分离的蛋白质,然而,这种方法工作强度大并且耗时。

[0008] 一种用于蛋白质后分离(post separation)但在免疫检测之前的检测的常用方法是将分离介质暴露于Ponceau S染色剂。此方法需要在致使蛋白质可见之前劳动密集型的染色和脱色步骤。使用此技术显示的蛋白质通常是不明显的和缺乏捕获数字图像所需的对照。另外,免疫检测的当前方法通常使用化学发光和照相胶片,来自Ponceau S染色的总蛋白

质的图像将不直接与靶蛋白质的图像比较。

[0009] 通常所用的另一种方法是使用两个恒定的电泳蛋白质分离物来比较蛋白质总量与靶蛋白质的总量。将一种分离介质染色以用于总蛋白质的检测而另一种介质被转移到用于靶蛋白质的免疫检测的固体膜。此方法在多种情况下(特别是贵重样品或仅小体积样品)不具吸引力。另外,正象多数人那样将样品加载到电泳设备,在不同电泳分离物之间人工比较蛋白质元素,由于不正确加载样品导致结果的不正确判读。

[0010] 这表明,确定蛋白质表达所需要的附加处理步骤导致以试剂和时间的形式的附加成本。此外,如果使用标准western印迹方法,使用者不能容易地比较在免疫检测前和后从同一分离的蛋白质样品得到的结果。

[0011] 关于标准western印迹方法的另一个问题是其包括多个步骤,所述多个步骤涉及若干不同设备,从而妨碍形成一体化,所述多个步骤还包括单独的设备,需要用它来对已经被探测到之后的最终样品成像。另外,这些多个步骤的多数包括湿化学,所述湿化学可导致重现性降低。例如,最广泛地使用检测靶蛋白质的方法为通过化学发光,并包括将照相胶片暴露于western印迹。为了定位与印迹接触的照相胶片,使用照相胶片需要将印迹转移到暗室,通常是远离实验室的一些地方。通常,需要显影暴露的胶片的照相胶片处理部件是昂贵的并且难于维护保养。使用照相胶片的另一个问题是获得适用于定量分析的靶蛋白质的不饱和图像需要耗时的反复试验并会出错。

[0012] 总的来说,标准western印迹方法为劳动密集型的、耗时的并且使用大量试剂。

发明内容

[0013] 从而,需要非常迅速的和高效的western印迹分析技术。

[0014] 本发明的实施例提供了进行western印迹分析技术的改良的方法,所述改良的方法通过提供快速的、高效的和方便的替代形式克服了多个上述问题。

[0015] 根据本发明的实施例的第一个方面,本发明提供了进行western印迹分析技术的方法,其中,所述方法包括依次执行下述步骤:

[0016] a). 预染色样品中的蛋白质;

[0017] b). 使用凝胶电泳分离蛋白质;

[0018] c). 分析所分离的蛋白质以确定总蛋白质含量和/或至少一个持家蛋白质含量;

[0019] d). 将蛋白质转移到至少一个膜上;

[0020] e). 探测分离的蛋白质以检测靶蛋白质;并且

[0021] f). 分析所探测的蛋白质以确定靶蛋白质的分子量和/或靶蛋白质的含量。

[0022] 在另一个实施例中,提供了一种设备,其被配置用于执行具有上述特征的方法。

[0023] 本发明已经开发出克服了至少部分下述缺点的系统:进行标准western印迹的科学家通过观察来比较实验内的样品和其它实验的样品,例如,比较靶蛋白质表达的浓度。通常,由眼睛来完成,以确定靶蛋白质是否比另一个更明亮。此方法在加载和初始样品制备中很容易出现错误。更严格地讲,并且通常需要公开的结果,需要比较靶蛋白质和加载对照蛋白质的亮度。为了进行比较,膜需要进行剥离和重新探查以加载对照蛋白质,这会增加实验的时间并且进一步增加实验的复杂性。

[0024] 与此种传统的方法相比,本发明的示例性实施例具有样品中的所有蛋白质被预染

色(步骤a)这样的优点。这使得该设备能够在电泳(步骤b和c)之后测量总蛋白质含量或加载对照蛋白质的量。一旦已经将蛋白质转移到膜并且执行western印迹(步骤d和e),膜就可使用相同措施重新分析以确定相对于总含量或加载对照(在步骤c中测量)的靶蛋白质的分子量和/或含量(步骤f)。本发明的方法具有显著的优点,即其不需要膜的剥离和重新探测以测量加载对照并且由于以相同的措施使用校准特征图像来进行分析,可直接比较电泳后和western印迹后的校准特征图像。

[0025] 通过使用本发明的这种实施例,科学家还可分析转移后的膜并且使用转移的结果作为质量控制步骤以确保良好的转移并作为加载对照。在标准的方法中,科学家将必然使用转移后的Ponceau S染色作为QC测试并且随后在探测前脱色。由于Ponceau S成像困难并且western印迹之后成像的不同方法,Ponceau S图像不易于与western印迹之后的图像比较。

[0026] 实施例的另外的优点为其不需要运行具体的western印迹分子量标准。由于电泳之后的原始图像与western印迹膜的校准,来自电泳的分子量标准提供了用于分子量的校准。

[0027] 本发明的实施例的方法允许使用者在探测分离的蛋白质中投入时间和精力之前检查是否已经成功地完成步骤b)和d)。另外,使用分离的蛋白质的分析结果来确定总蛋白质否定了在步骤e)之后所需要的加载对照的再探测。

[0028] 然后,使用此方法产生的数据可用于执行在整个不同通道和不同样品中的靶蛋白质的半定量分析。然后,可将总蛋白质加载和/或持家蛋白质含量与靶蛋白质含量比较以获得总蛋白质和/或持家蛋白质与靶蛋白质的比率。总蛋白质含量和/或持家蛋白质含量还可用作加载对照。这允许用于靶蛋白质浓度的精确的通道对通道的比较。

[0029] 计算总蛋白质或持家蛋白质相对靶蛋白质的比率的优选的实施例使用适当的成像系统,所述成像系统能够检测和记录荧光,所述荧光由荧光基团在特定波长处激发来产生,例如LAB901磁带机。数据产生强度对沿着电泳凝胶的距离的图。总蛋白质曲线下的面积,或者就持家蛋白质或靶蛋白质而言,单峰下的面积,被认为是“含量”。然后,可计算总蛋白质或持家蛋白质相对靶蛋白质含量的比率。在另一个实施例中,可使用毛细管电泳而不是凝胶电泳以分离样品中蛋白质的混合物。在这种情况下,当测量荧光的强度时,时间轴线取代距离轴线,荧光的强度将在生物分子转移通过毛细管时的固定点处被测量。因此,相对时间绘制强度,在蛋白质分离开始后的固定点处检测所述荧光。

[0030] 可使用若干方法以确定样品中存在的靶蛋白质的浓度。一种这样的方法是使用蛋白质的已知浓度来产生校准曲线。例如,可在western印迹分析化验时使用已知的浓度的蛋白质并且使用此分析的含量数值以建立校准曲线。然后,根据此校准曲线读取来自western印迹分析的靶蛋白质含量以产生给定样品内的靶蛋白质的浓度。优选地,用于产生校准曲线的蛋白质为靶蛋白质的已知浓度,然而,在多种情况下是不可能的并且会同样地使用不同的蛋白质来得到此校准曲线。例如,通常使用牛血清白蛋白(BSA)和牛血清丙种球蛋白(BGG)以得到蛋白质定量分析中的校准曲线。可借助于适当的软件和程序控制计算机来执行靶蛋白质含量的计算。可通过使用蛋白质样品的稀释液系列来提高此计算的精确性。另一个方法可涉及比较靶蛋白质含量和通道内标记物中的已知含量。

[0031] 可测量总蛋白质含量和至少一个持家蛋白质含量两者以用作加载对照。两个加载

对照计算的内含物可提高校准(用于靶蛋白质的测量)的总精确度。

[0032] 可使用多种化合物以预染色蛋白质,所述多种化合物包括荧光基团,例如可从Active Motif获得的基于染料的pyrillium、可从Molecular Probes获得的Alexa Flu或染料、可从Thermo Fisher Scientific获得的DyLight染料、可从Atto Tec获得的Atto染料以及可从GE Healthcare获得的Cy染料。可使用单个荧光基团或一种以上荧光基团预染色蛋白质。

[0033] 凝胶电泳完成时,分离的蛋白质位于凝胶的基质内。用于凝胶电泳中的凝胶可在使用时通过注入模具来制成,这就允许在使用后容易取得凝胶内的分离的组分。然而,预包装的凝胶(其中将凝胶包装到容器内),例如Lab901 ScreenTape®范围已变得更普及地用于凝胶电泳中,特别用于蛋白质分离。因为预包装的凝胶使用更方便,以及提供更好的可重现性结果并且使用和处理更安全。因此,当在凝胶电泳中使用预包装凝胶作为在下游分析技术之前的上游制备技术时,需要分离的组分可被获取并且可从预包装凝胶内提取。因此,本发明的实施例的方法可包括在凝胶电泳之后而不是在分析和/或探测分离的蛋白质之前获取容器内的凝胶的附加步骤。另外,可使用程序控制计算机以控制凝胶电泳期间使用的电压和时间。

[0034] 通常,使用凝胶电泳分离蛋白质的步骤将允许蛋白质的一维分离,然而,蛋白质的二维分离也可以。一维分离可根据蛋白质的分子量用于分离蛋白质,而二维分离可根据它们的重量和它们的等电点来分离蛋白质。

[0035] 通常,分析分离的蛋白质以确定总蛋白质含量包括:捕获凝胶内预染色的分离蛋白质的图像。

[0036] 通常,将分离的蛋白质从凝胶转移到至少一个膜以有助于探测分离的蛋白质。传统的转移过程包括将单个大量的电泳凝胶上的蛋白质转移到单个薄膜上。如果需要独立地探测蛋白质样品,那么将膜切成含有蛋白质样品的单个部分。尽管此方法适用于本发明的实施例,但此方法为耗时的并且为独立地探测多个样品的不精确的方法。将使用一种更有利的方法,Lab901's ScreenTape®技术,所述技术提供了同时将16蛋白质分离物传输到16单独的预包装凝胶上(如WO 06/085071所述)。

[0037] 如果使用预包装凝胶以分离蛋白质样品,那么然后可使用一些形式的凝胶提取措施以确保通过相对容器转移凝胶来从容器提取分子分离凝胶。从容器提取凝胶的方法可包括吸出、吹出、推挤、拉出或清洗出凝胶。然而,最优的推挤措施是通过推挤凝胶来相对于容器移动凝胶。推挤凝胶可使用施用于容器的至少一个凝胶推挤元件来实现,例如,多个凝胶推挤元件可施用于容器内的多个子容器。多个凝胶推挤元件可形成梳状物并且可将所述推挤元件引导至特定区域。优选地,往复于凝胶表面的各凝胶推挤元件的部件基本上符合推挤元件和凝胶之间的界面的形状和尺寸。这有助于从容器转移全部凝胶,同时保持凝胶的纵横比。然而,所述凝胶推挤元件是弹性可变形的以允许所述子容器的内部的形状和尺寸以及所述凝胶推挤元件与所述容器的对准等方面的小变化。一种提供弹性可变形的凝胶推挤元件的措施为将各凝胶推挤元件的末端分流到通过狭缝分离的单独的裂片中。另一种提供弹性可变形的凝胶推挤元件的措施可涉及使用弹性体的涂层或推挤元件尖端处的蜡。

[0038] 本发明的实施例还可包括物理处理凝胶容器的步骤以有助于提取凝胶。例如,旋

转容器、轻轻地施加压力或按压容器以最小化凝胶和容器表面之间的表面张力。此物理处理可通过机械处理用手来完成。

[0039] 步骤d的转移过程使用电场以将蛋白质从凝胶转移至至少一个膜。确保将蛋白质从凝胶完全转移到膜是western印迹成功的关键。因此,可使用程序控制计算机以控制在将分离的蛋白质转移到至少一个膜上期间使用的电压和时间。

[0040] 转移分离的蛋白质可允许使用者将大量的分离的蛋白质的样品分成较小的分离的蛋白质的子样品,其允许将不同的探针用到各子样品上。作为另外一种选择,可将不同浓度处的单个探针用到各子样品上以优化探测方案。在另一个实施例中,可转移多个分离的蛋白质的样品以允许使用者同时探测多个分离的蛋白质的样品。

[0041] 可将多个膜用于多个子样品或多个分离的蛋白质的样品。作为另外一种选择,可将单个膜用于多个样品或多个子样品。

[0042] 使用分离成为部分的单个膜允许使用较小体积的探测溶液,进一步优化分离的蛋白质的探测。在实施例中,其中使用Lab901's ScreenTape技术执行蛋白质分离直到可将分离的蛋白质的16个样品转移到分离成16部分的单个膜。

[0043] 用于本发明方法的合适的膜包括由PVDF或硝化纤维组成的那些膜。优选地,膜为亲水性的或已经被处理为亲水性的,由此可改善分离的蛋白质和膜的表面的接触。

[0044] 在另一个实施例中,使用优化的条件来执行膜的转移以防止较小的蛋白质比较大的蛋白质更快地迁移透过膜。这种现象称为“渗漏”。渗漏导致接触电极的表面与接触凝胶表面之间的蛋白质分布差异。针对此问题,本文描述的方法可包括进行转移到优化的缓冲液中以防止渗漏的附加步骤。缓冲液的优化可包括改变转移缓冲液的pH、缓冲液的类型、使用不连续缓冲液,即,正极和负极印迹纸中不同的缓冲液以及膜中的再次不同,或通过每厘米地改变整个凝胶上的电压。针对整个凝胶,每厘米地改变跨越凝胶的电压以在凝胶的底部处提供较弱的强效电场,其中较小的蛋白质在电泳之后转移到此,并且在凝胶的顶部处提供更强效的电场,其中较大的蛋白质在电泳之后转移到此。

[0045] 在另一个实施例中,在处理中使用的印迹纸具有某些特性和光滑度。确保蛋白质有效地转移的关键因素是确保印迹纸和膜之间有效地接触。不良接触可导致妨碍有效分析蛋白质的最终图像的不均匀转移并出现“斑点”。

[0046] 如此前状态,传统的western印迹方法将蛋白质从单个电泳凝胶转移到单个膜。如果需要独立地探测转移到膜的蛋白质样品,那么膜必须切成单个部分。如上所述,在实施例中,其中使用预包装Lab901 ScreenTape®技术并且将凝胶片段提取到单个膜上,然后可使用处理的膜独立地执行不同样品、或不同通道中同一样品的不同处理以防止通道之间的流体转移。可使用加热或超声焊接来处理膜(例如PVDF)的部分,以产生各个蛋白质转移区域。处理操作使围绕产生不漏液屏障的这些部分的膜固化。这些不漏液屏障防止流体从一个通道流(芯吸)到另一个通道以使得只有未处理区域允许流体穿透膜。因此,可建立各个蛋白质转移区域,其中可将蛋白质转移并且随后独立地处理。

[0047] 转移后和靶蛋白质检测前的附加步骤可捕获电泳凝胶转移后的图像,作为转移效率的质量控制步骤。可使用此图像与转移之前获取的凝胶的图像比较以确保已经出现的蛋白质完全转移。如果蛋白质转移不完全或不成功,那么添加的此步骤可节省宝贵的时间和资源。另一个质量控制步骤是对转移到至少一个膜上的总蛋白质进行成像。在将蛋白质已

经转移到至少一个膜上之后捕获分离的蛋白质的图像允许检查转移的蛋白质,以确保在凝胶提取和转移步骤期间蛋白质没有翘曲或变形。

[0048] 在确认转移过程已经成功发生之后,可随后探测膜以检测步骤e中的靶蛋白质。传统上,此方法涉及很大程度的膜的物理处理和大体积的培育溶液(如抗体溶液)。首先,封闭膜以防止一级抗体非特异性的结合到膜。然后,将一级抗体培育物被涂敷到膜上并且在振荡器上培育。培育之后,将一级抗体溶液移除并且洗若干次。然后,涂敷二级抗体并且利用振荡法再次培育。随后,将二级抗体移除并且再次洗膜。针对膜的探测的传统的方法适合于当前的发明的实施例,然而,还可使用培育设备以减小必需液体的体积并且能够独立地探测不同的样品通道。

[0049] 培育设备可包括掩模和至少一个膜,其中掩模中的小孔形成分离的部分。分离的部分由掩模形成,所述掩模包括凸起的屏障,以及其中至少一个膜位于各分离部分内。培育设备还可包括围绕部分形成的溢流区域,使得可使用较大体积的液体以同时覆盖全部部分。因此,可将小体积的液体设置到部分中以独立地处理膜的部分或可将较大体积的液体设置到填充所有部分的所有样品上方,但将液体保持在可控制区域。

[0050] 培育设备可包括涂膜剂和可装配的对准特征。使用所述对准特征,在掩模上的定位可对应于凝胶电泳期间使用的容器上的相应的对准特征。这些对准特征有助于蛋白质分离的结果与培育的结果的比较。

[0051] 培育设备还可包括在与膜的界面处的流体密封的可变形的垫圈,形成在分离的部分周围的不漏液密封件。因此,由于流体密封性的可变形的垫圈,设置在一个通道上的流体不能溢出膜流到相邻的通道,并且由于热处理,所述流体不能透过膜流到相邻的通道。流体密封性的可变形的垫圈有精确的尺寸以位于各个蛋白质转移区域周围,将有助于形成不漏液屏障以防止样品通道之间的交叉污染。因此,可设计各个蛋白质转移区域以精确地定位培育设备的分离的部分。

[0052] 作为另外一种选择,可通过疏水性屏障将培育设备成分离的部分。这些疏水性屏障可包括通过网版印刷涂敷的胶和/或油墨。

[0053] 可使用结合到培育设备内的抽真空装置将施加到由培育设备产生的部分的流体移除。可使用真空抽吸通过膜将液体抽到设置在其下面的垃圾容器。

[0054] 通常,检测靶蛋白质涉及检测发光或荧光标记,其在步骤e)期间使用一个或两个步骤的方法被共价地键合到靶蛋白质上。在一个步骤方法中,标记被共价地键合到至少一个能够键合到靶蛋白质的抗体。在两个步骤方法中,能够键合到靶蛋白质的至少一个未标记抗体(一级抗体)利用膜培育,然后洗膜并利用至少一个抗体(二级抗体)培育,所述二级抗体能被共价地键合到标记并且能够键合到一级抗体。

[0055] 通常使用的化学发光免疫检测标记物的一个示例是辣根过氧化物酶(HRP)。将此酶键合到抗体并且用于将不发光基底转化为发光产物,所述发光产物可使用照相胶片来检测。由于键合到膜的抗体的数量增加而增加大量的靶蛋白质,所以发光产物的量由键合到那些抗体的HRP酶来产生。

[0056] 当将荧光基团键合到抗体并且用于蛋白质检测时,该过程与先前所述的大致相同,不同之处在于不需要化学发光标记基底。而是在特定波长处激发荧光基团并且通过适当的成像系统来记录产生的荧光。

[0057] 分析探测的蛋白质以确定靶蛋白质含量通常涉及捕获靶蛋白质的图像。比较探测的蛋白质的图像和分离的蛋白质的图像,使使用者能够确定样品中存在的靶蛋白质的量。因此,所述总蛋白质和/或持家蛋白质可与荧光基团相关并且所述靶蛋白质可与荧光基团相关,所述荧光基团在来自与所述总蛋白质和/或持家蛋白质相关的所述荧光基团的不同波长处激发并发射。

[0058] 分析分离的蛋白质以及分析探测的蛋白质可包括使用软件分析技术处理分析数据。优选地,使用单个分析设备分析分离的蛋白质以确定总蛋白质含量和/或持家蛋白质以及分析探测的蛋白质以确定靶蛋白质含量。例如,可在分析步骤中均使用TapeStation®(可从Lab901获得)。TapeStation®可检测多个波长并且因此在其中检测荧光基团的实施例中使使用者能够确定总蛋白质含量,并且检测另一个荧光基团使使用者能够确定靶蛋白质含量,可使用TapeStation®来测量蛋白质表达的变化。相似地,其中检测一个荧光基团使使用者能够确定“持家”蛋白质的含量并且检测另一个荧光基团使使用者能够确定靶蛋白质含量,均可使用TapeStation®来检测“持家蛋白质”的量和使半定量分析成为可能的总蛋白质含量。计算的量将不必很精确,然而,靶含量和总含量之间的比率为精确的并且可使用此比率来确定表达的变化和精确地定量。

[0059] 可使用对准特征(如穿孔、基准边、基准面、光学基准点、成型部件、或任何它们的组合)以有助于绘制分析分离的蛋白质的结果和分析探测的蛋白质的结果。凝胶容器可包括可用于与支撑体结合的对准特征以确定与所述电泳容器内的它们的初始定位相关的所述凝胶部分的定位。根据对准特征的特性的这些对准特征通过(例如)数字图像捕获设备(如,CMOS或CCD数字照相机)并且通过已装到分析设备上的软件结合像素来分析。优选地,在同一设备(如购自Lab901的TapeStation®)上执行两个分析步骤,因此,这还有助于绘制分离的蛋白质的分析结果和探测的蛋白质的分析结果。

[0060] 由于能够将靶蛋白质精确地绘制到初始分析,就有可能辨识第一分离内的靶蛋白质峰值。然后,可将第一分离内的此峰值用于精确的定量,而不是根据抗体的亲和力。作为另外一种选择,如果靶蛋白质为可分离的和可独立地定量的已知蛋白质,那么可运行样品的稀释液系列以提供校准曲线,利用该校准曲线可根据精确的定量倒推计算未知样品。

[0061] 可使用单个计算机来控制用于蛋白质分离和蛋白质转移过程的设备,可使用所述单个计算机来设定用于这些过程的电压和时间。可由使用者根据用于各种蛋白质类型或由使用者(其中,可以优化它们以实现他们的特定需求)可编程的一个优选的预设定的程序之中的一个来选择时间和电压的分布。

[0062] 有助于绘制分离的蛋白质的分析结果和探测的蛋白质的分析结果的另一个措施使用通道内标记物,该措施可在步骤a)期间插入添加。在本发明的实施例的背景下,“通道内标记物”是指在分离之前添加到样品的蛋白质,其中将分离之后在靠近后凝胶的顶部或底部位置接收蛋白质。因此,道内标记物允许使用者辨识分离后的已知蛋白质片段,以及从而允许使用者通过比较这些校准片段来预测样品中其它蛋白质片段的尺寸。还可使用数字图像捕获设备(数字照相机)并且结合可辨识所有分离的片段和通过比较通道内标记物预测它们的尺寸的软件来执行此过程。优选地,为了轻松的辨识,将利用另一个荧光基团来标记通道内标记物。可使用同一类型的荧光基团以预染色蛋白质并且可使用同一类型的荧光

基团,同时还可使用探测分离的蛋白质以使通道内标记物的辨识成为可能。

[0063] 此外,可使用分子量定径标记物以有助于绘制分离的蛋白质的分析结果和探测的蛋白质的分析结果。可将分子量定径标记物添加到电泳凝胶上的空通道并且与样品在相同时间分离或此前运行的数码存储。

[0064] 优选地,使用对准特征、分子量定径标记物和/或通道内标记物以有助于绘制分离的蛋白质的分析结果和探测的蛋白质的分析结果。

[0065] 在实施例中,其中膜经过处理以形成分离的区域,各个分离的蛋白质转移区域和/或不透液区域充当为可信的标记物以有助于膜和其内含有的蛋白质的成像期间的校准操作。

[0066] 在使用不止一个荧光基团(如用于预染色的第一荧光基团、能够测定靶蛋白质含量的第二荧光基团、以及能够辨识通道内标记物的第三荧光基团)的实施例中,各荧光基团可在不同波长处激发并发射以使得各荧光基团可在分析期间独立地辨识。

[0067] 分析分离的蛋白质和/或探测的蛋白质可包括通过参考存储的信息(例如附着到凝胶容器的条形码和/或附着到在探测之前可将凝胶转移到其内或其上的任何夹持器的条形码)辨识样品的步骤。优选地,条形码耐受于免疫检测中使用的化学品,例如甲醇。因此,可从准备分离直到分析探测的样品过程中对样品进行跟踪。此外,使用此措施来辨识和跟踪样品就允许记录附加的信息,例如在步骤b)、步骤c)、步骤d)、以及步骤e)之间用去的时间。由能够辨识提取的凝胶的措施提供的可跟踪的和附加的信息使得良好的实验室规范和良好的生产规范成为可能。通常,western印迹技术还用于诊断测试,例如H1V和BSE测试,其中整个测试过程的可跟踪性是非常有益的。

[0068] 在实施例中,提供了进行western印迹分析技术的方法,其中该方法包括依次执行下述步骤:

- [0069] a). 提供含有蛋白质的样品;
- [0070] b). 预染色样品中的蛋白质;
- [0071] c). 使用凝胶电泳分离蛋白质;
- [0072] d). 分析所分离的蛋白质以确定总蛋白质含量;
- [0073] e). 探测分离的蛋白质;以及
- [0074] f). 分析所探测的蛋白质以确定靶蛋白质含量。

附图说明

[0075] 本发明的实施例示出了以下示例和附图,其中

[0076] 图1为典型的western印迹方法的一个实施例的流程图;

[0077] 图2为使用Lab901's ScreenTape®和TapeStation®技术的本发明的一个实施例的流程图;

[0078] 图3示出了由凝胶电泳(NuPAGE®)分离蛋白质之后直接分析分离的蛋白质的结果,分离之后转移分离的蛋白质(Novex®半干转移)并且随后利用抗体(SNAPid®)培育,根据示例1进行制备。

[0079] 图4示出了电泳之后的总蛋白质、已经转移到膜的总蛋白质、和根据示例1使用PVDF膜制备的靶蛋白质的轮廓比较。

[0080] 图5a)示出了,根据示例2进行制备的,通过凝胶电泳使用Lab901ScreenTape系统(P200)分离蛋白质之后直接分析分离的蛋白质的结果,在转移(LAB901ScreenTape®提取和转移过程)分离的蛋白质之后的结果,以及利用抗体(柱-Ab)培育之后的结果,根据示例2进行制备;以及图5b)示出了从图5a)获得的重叠的轮廓曲线。

[0081] 图6a)示出了,根据示例3进行制备的,通过凝胶电泳(P200)分离蛋白质之后直接分析分离的蛋白质的结果,在转移(LAB901ScreenTape®提取和转移过程)分离的蛋白质之后的结果,以及利用抗体(柱-Ab)培育之后的结果;以及图6b)示出了从图6a)获得的重叠轮廓曲线。

[0082] 图7示出了检测到的等量总蛋白质与靶蛋白质的比率,所述比率与系统中使用的总蛋白质稀释液无关。

[0083] 图8示出了检测到的总蛋白质与靶蛋白质的比率,所述比率对应于添加到系统的靶蛋白质的浓度。

具体实施方式

[0084] 示例1

[0085] 凝胶电泳

[0086] 按如下方式制备含有蛋白质的样品:

[0087] a. 在75°C利用20 μ l荧光染色剂培育20 μ l蛋白质样品7分钟;以及

[0088] b. 添加40 μ l加载缓冲液,混合并在75°C再培育5分钟。

[0089] 另外,按如下方式制备对照样品:

[0090] a. 将20 μ l蛋白质样品与10 μ l还原剂和4x 25 μ l的Invitrogen's LDS缓冲液;以及

[0091] b. 在75°C培育5分钟。

[0092] 将两种样品加载到NuPAGE电泳凝胶并且根据生产商的标准方案运行以分离蛋白质,并且随后使用UV透射器和数字照相机来捕获凝胶的图像。

[0093] 将分离的样品转移到膜上

[0094] 该凝胶包括分成两等分的分离的蛋白质并且随后将一半转移到PVDF膜上以及将另一半转移到硝化纤维膜上。使用滤纸将分离的蛋白质分别电转移到两个膜上并且在20%甲醇Tris-Glycine1转移缓冲液中浸湿膜以组装由3x印迹纸/膜/凝胶/3x印迹纸构成的转移夹层。在Invitrogen'sNovex®半干转移系统中放置每个转移夹层并且将蛋白质在25V处转移45分钟。

[0095] 探测分离的和转移的样品

[0096] 使用培育设备(例如Millipore'sSNAPid®系统)利用抗体按如下方式培育膜上的分离的蛋白质:

[0097] a. 将膜放置到预浸湿的印迹支撑架中;

[0098] b. 在磷酸吐温缓冲液(PBST)中使用0.05%脱脂奶粉(NFDM)来封闭非特异性键合位点;

[0099] c. 一级抗体培育:溶菌酶抗体按1:1000浓度并且培育10分钟;

[0100] d. 利用PBST洗3次;

[0101] e. 二级抗体培育:羊抗兔IgG-HRP (Goat anti-Rabbit IgG-HRP)按1:10,000浓度

并且培育10分钟；

[0102] f. 利用PBST洗3次；

[0103] g. 从印迹支撑架取出膜并且设置到粘性薄膜上。

[0104] h. 添加四甲基联苯胺 (TMB) 基底并且培育20分钟；以及

[0105] i. 扫描该膜。

[0106] 使用**GeneTools®**软件以针对电泳介质、膜以及膜柱TMB来调控分离的位置使得轮廓曲线可为重叠的。图3示出了**GeneTools®**分析的结果。

[0107] 示例2

[0108] 凝胶电泳

[0109] 按如下方式制备含有蛋白质的样品：

[0110] a. 在75°C处利用2 μ l荧光染色剂培育2 μ l蛋白质样品7分钟；

[0111] b. 添加4 μ l加载缓冲液，混合并在75°C处培育5分钟；以及

[0112] c. 添加2 μ l通道内标记物。

[0113] 将样品加载到Lab901P200**ScreenTape®**电泳凝胶上并且根据生产商的标准方案运行以分离蛋白质。使用Lab901**TapeStation®**对所用的**ScreenTape®**进行成像(参见图5a中“P200”)。

[0114] 将分离的样品转移到膜上

[0115] 包括分离的蛋白质的所用的**ScreenTape®**从**TapeStation®**恢复，移除其载体层并且使用两个刀片以切除**ScreenTape®**的顶部和底部，暴露包含在16个子容器内的凝胶柱的顶部和底部。将包括16个凝胶推挤元件的梳状物用于推动各子容器内的凝胶以使得凝胶被抽取到在20%甲醇Tris-Glycine转移缓冲液中浸湿的PVDF膜上。该膜位于在20%甲醇Tris-Glycine转移缓冲液中浸湿的一片印迹纸的顶端，印迹纸和膜均被支撑在正极上。将在20%甲醇Tris-Glycine转移缓冲液中浸湿的第二片印迹纸设置到负极上并且将负极封闭到正极上，以及在50V/cm处将蛋白质转移10分钟。将印迹纸和凝胶从膜移除并且将膜转移到抗体探测程序。

[0116] 质量控制步骤

[0117] 使用Lab901**TapeStation®**将后转移膜成像。将电泳之后记录的总蛋白质图像使用可信标记物和对准特征重叠到被转移到膜上的总蛋白质的图像之上。然后，在进行免疫检测程序之前评价转移程序的效率。在此分析之后，随后将膜转移到抗体培育设备。

[0118] 探测分离的和转移的样品

[0119] 使用Millipore**SNAPid®**系统利用抗体按如下方式对膜上的分离的蛋白质进行培育：

[0120] a. 将膜放置到预浸湿的印迹支撑架中；

[0121] b. 在磷酸吐温缓冲液 (PBST) 中使用0.05%脱脂奶粉来封闭非特异性键合位点；

[0122] c. 一级抗体培育：溶菌酶抗体按1:1000浓度并且培育10分钟；

[0123] d. 利用PBST洗3次；

[0124] e. 二级抗体培育：羊抗兔IgG-Alexa488 (Goat anti-Rabbit IgG-Alexa488) 按1:10,000浓度并且培育10分钟；

- [0125] f. 利用PBST洗3次；
- [0126] g. 从印迹支撑架取出膜并且设置到粘性薄膜上；
- [0127] h. 将膜成像到**TapeStation®** (参见图5a中的“柱Ab”)
- [0128] 使用**GeneTools®**软件将分离的蛋白质和探测的蛋白质的轮廓曲线重叠(图5b)。
- [0129] 示例3
- [0130] 凝胶电泳
- [0131] 按如下方式制备含有蛋白质的样品：
- [0132] a. 在75°C处利用2 μ l荧光染色剂培育2 μ l蛋白质样品7分钟；
- [0133] b. 添加4 μ l加载缓冲液,混合并在75°C处培育5分钟;以及
- [0134] c. 添加2 μ l通道内标记物。
- [0135] 将样品加载到Lab901P200**ScreenTape®**电泳凝胶上并且根据生产商的标准方案运行以分离蛋白质。使用Lab901**TapeStation®** (参见图6a中“P200”)成像所用的**ScreenTape®**。
- [0136] 将分离的样品转移到膜上
- [0137] 包括分离的蛋白质的所用的**ScreenTape®**从**TapeStation®**恢复,移除其载体层并且使用两个刀片以切除**ScreenTape®**的顶部和底部,暴露包含在16个子容器内的凝胶柱的顶部和底部。将包括16个凝胶推挤元件的梳状物用于推动各子容器内的凝胶以使得凝胶被抽取到在20%甲醇Tris-Glycine转移缓冲液中浸湿的PVDF膜上。具有各个蛋白质转移区域的膜优先通过热处理PVDF膜来产生。该膜位于在20%甲醇Tris-Glycine转移缓冲液中浸湿的一片印迹纸的顶端,印迹纸和膜均被支撑在正极上。将在20%甲醇Tris-Glycine转移缓冲液中浸湿的第二片印迹纸放置到负极上并且将负极封闭到正极上,以及在50V/cm电压处将蛋白质转移10分钟。将印迹纸和凝胶从膜移除。剩下的与印迹纸关联的凝胶被后转移且从膜上完全脱离。
- [0138] 质量控制步骤
- [0139] 使用Lab901**TapeStation®**将后转移(post-transfer)膜成像。将电泳之后记录的总蛋白质图像使用可信标记物和对准特征重叠到被转移到膜上的总蛋白质的图像之上。然后,在进行免疫检测程序之前评价转移过程的效率。在此分析之后,随后将膜转移到抗体培育设备。
- [0140] 探测分离的和转移的样品
- [0141] 将膜上的分离的蛋白质按如下方式转移到培育设备：
- [0142] a) 手动地或自动地将由不透液部件围绕的各个蛋白质转移区域构成的膜重新定位到包括测量各个蛋白质转移区域的确切尺度的部件的基底上；
- [0143] b) 将膜设置到基底上以使得实现精确的校准；
- [0144] c) 将基底固定在垃圾盒的顶部,所述垃圾盒包括连接到真空歧管的装置。
- [0145] d) 然后,使用配合到基底掩模之上的上掩模将膜固定,所述基底掩模包括测量各个蛋白质转移区域的确切尺度的部件。
- [0146] e) 一旦固定到培育设备内,围绕该部件的流体密封性的可变形的垫圈就形成流体

密封性密封件。

[0147] 然后,按如下方式使用免疫检测以探测膜:

[0148] a. 在磷酸吐温缓冲液中使用0.05%脱脂奶粉来封闭非特异性键合位点;

[0149] b. 一级抗体培育:溶菌酶抗体按1:1000浓度并且培育10分钟;

[0150] c. 利用PBST洗3次;

[0151] d. 二级抗体培育:羊抗兔IgG-Alexa488按1:10,000浓度并且培育10分钟;

[0152] e. 利用PBST洗3次;

[0153] f. 将膜成像到TapeStation® (参见图6a中的“柱Ab”)。

[0154] 使用Lab901的GeneTools®软件,将分离蛋白质的后电泳和后转移的轮廓曲线重叠。

[0155] 示例4

[0156] 为了证明系统的灵敏度和重现性,在稀释范围上以同一样品计算靶蛋白质含量与总蛋白质含量的比率。将未稀释的蛋白质样品以及按1:3和1:9稀释的同一样品用于LAB901western印迹方案(参见示例3)。将总蛋白质测量安排在将蛋白质转移到膜之前的质量控制步骤中。免疫检测步骤之后测量靶蛋白质浓度。用三个浓度比较总蛋白质含量和靶蛋白质含量的比率,如图7所示,其中示出在稀释范围内比率一致。这表明系统对含有更高浓度的蛋白质的样品的灵敏度与对含有较低浓度的蛋白质的样品的灵敏度产生相同的比率。其还表明将总蛋白质含量用作加载对照的能力。考虑到将同一样品加载到不同通道或将已知稀释度的样品已经制成并加载到不同通道,可归一化通过不同通道的总蛋白质的浓度变化以有助于比较和重现性。通常,样品含量的轻微变化可引起蛋白质浓度的半定量western印迹分析期间不规则的数值。使用来自不同通道定量的总蛋白质进行归一化大大地提高了分析结果和质量结果的重现性。

[0157] 示例5

[0158] 为了进一步证明系统的灵敏度,将不同量的靶蛋白质添加到7mg/ml的相同细胞裂解液以形成稀释液系列。使用LAB901ScreenTape®电泳凝胶来分离蛋白质样品。分离之后,通过使用Lab901TapeStation®系统成像来计算总蛋白质含量。然后,将蛋白质转移到膜并且使用LAB901western印迹方案(参见示例3)来进行靶蛋白质的免疫检测。使用总蛋白质含量以归一化靶蛋白质含量的数值并且,如图8可见,靶蛋白质与总蛋白质的比率显示了与添加到样品的靶蛋白质的量对应的靶蛋白质的减少。这证明,该系统具有精确地并且重现性地检测上下调节的蛋白质的能力。

[0159] 应该指出的是,术语“包括”不排除其它元素或步骤并且“一”或“一个”不排除多个。另外,结合不同实施例而描述的要素可组合。还应该指出的是,权利要求中的参考标记不应被理解为限制权利要求的范围。

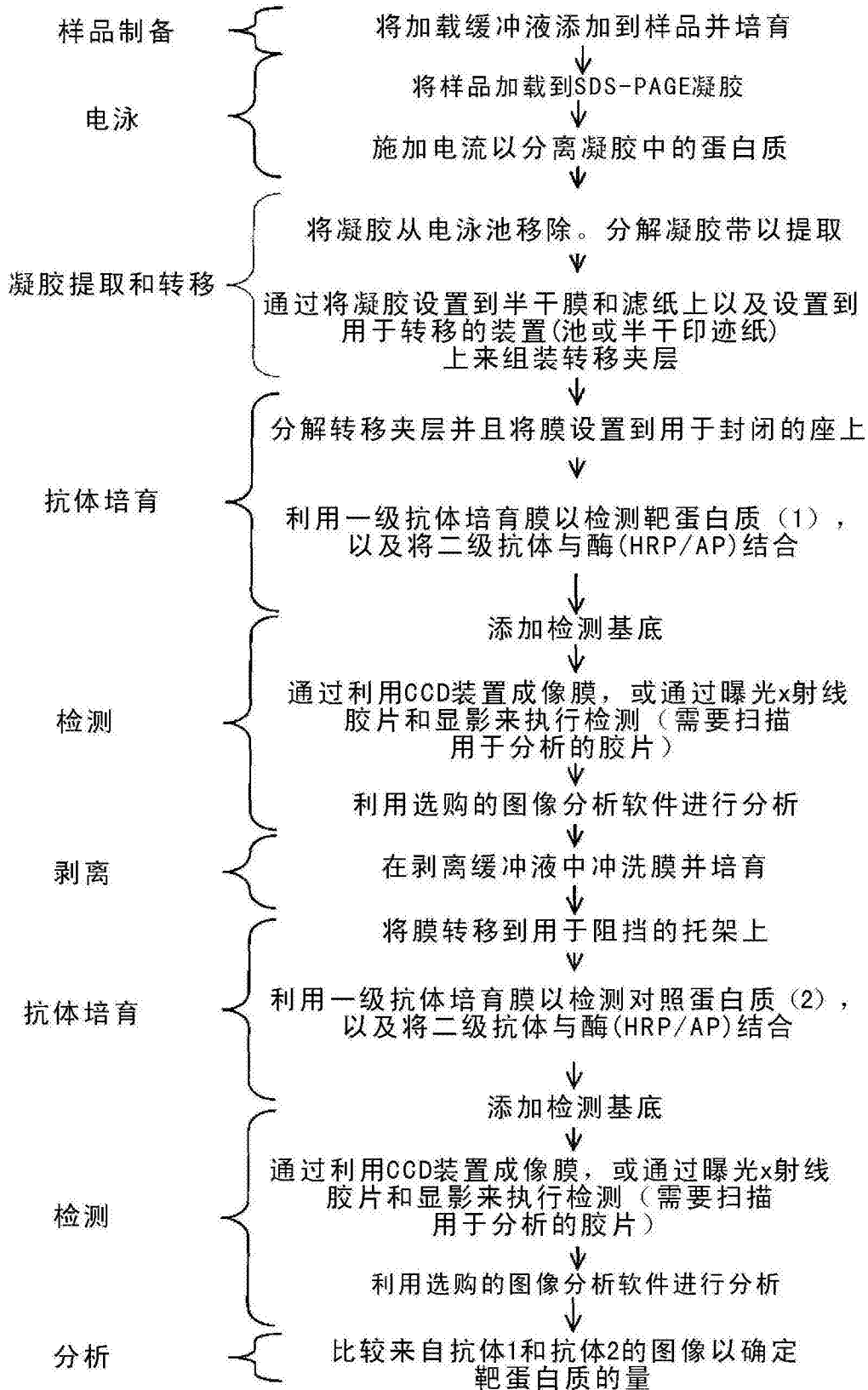


图1

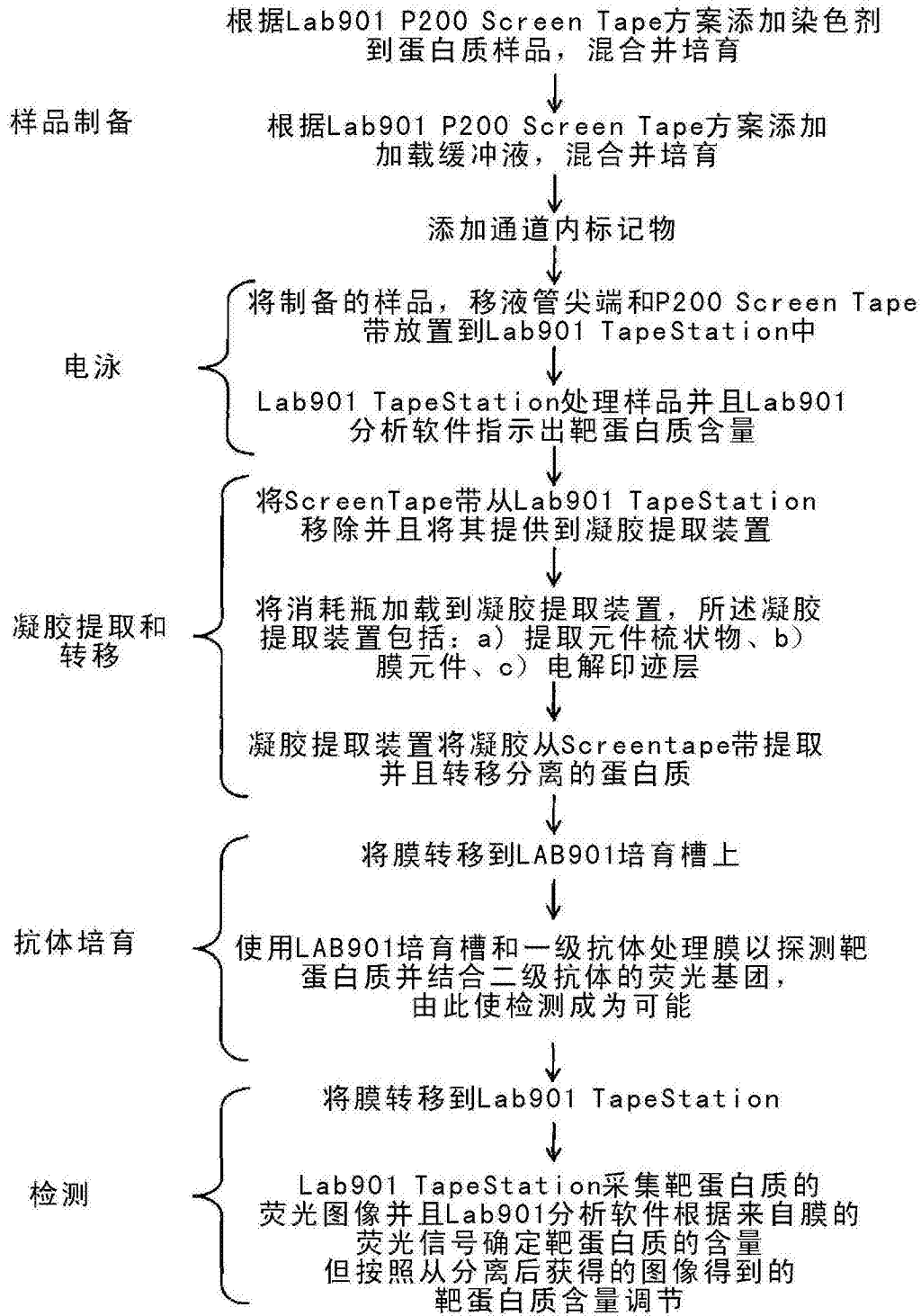


图2

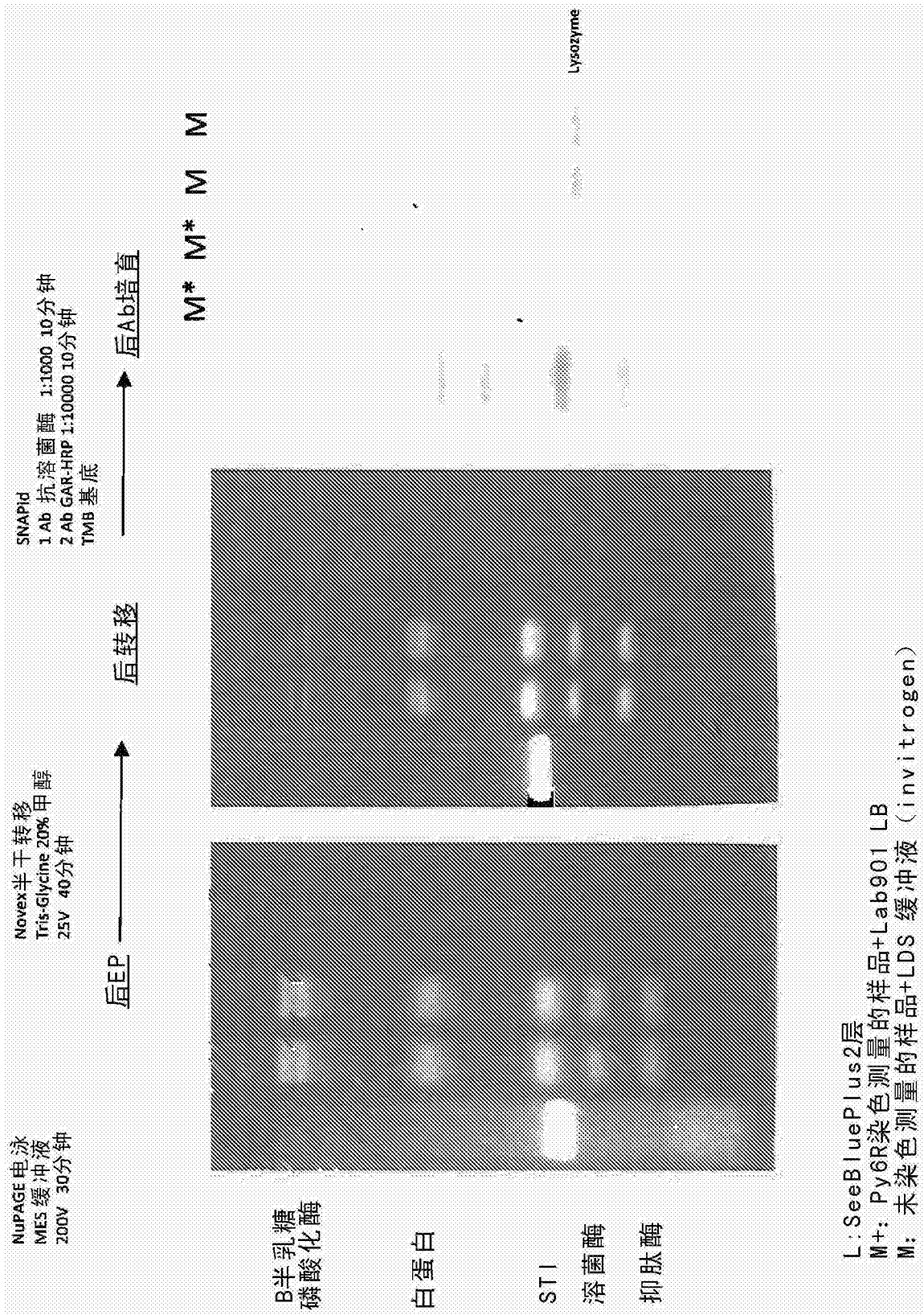


图3

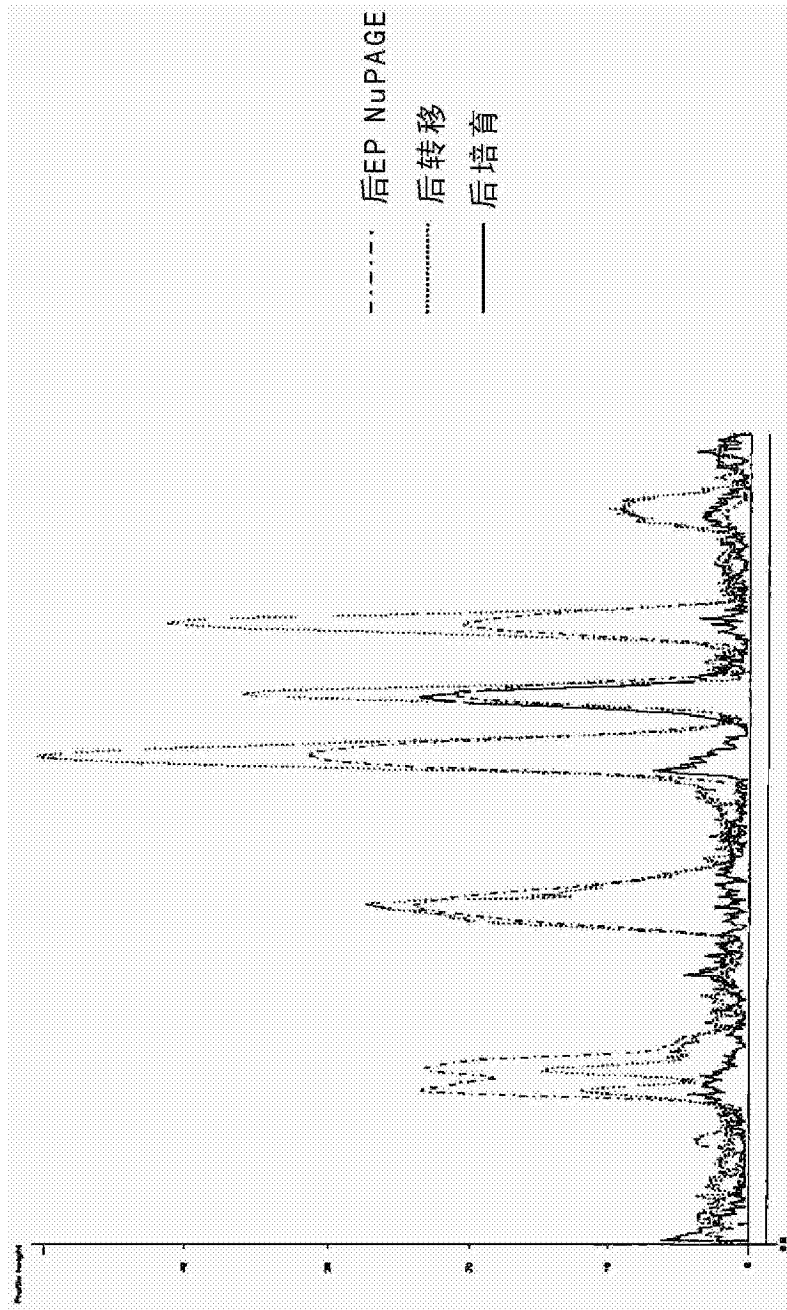


图4

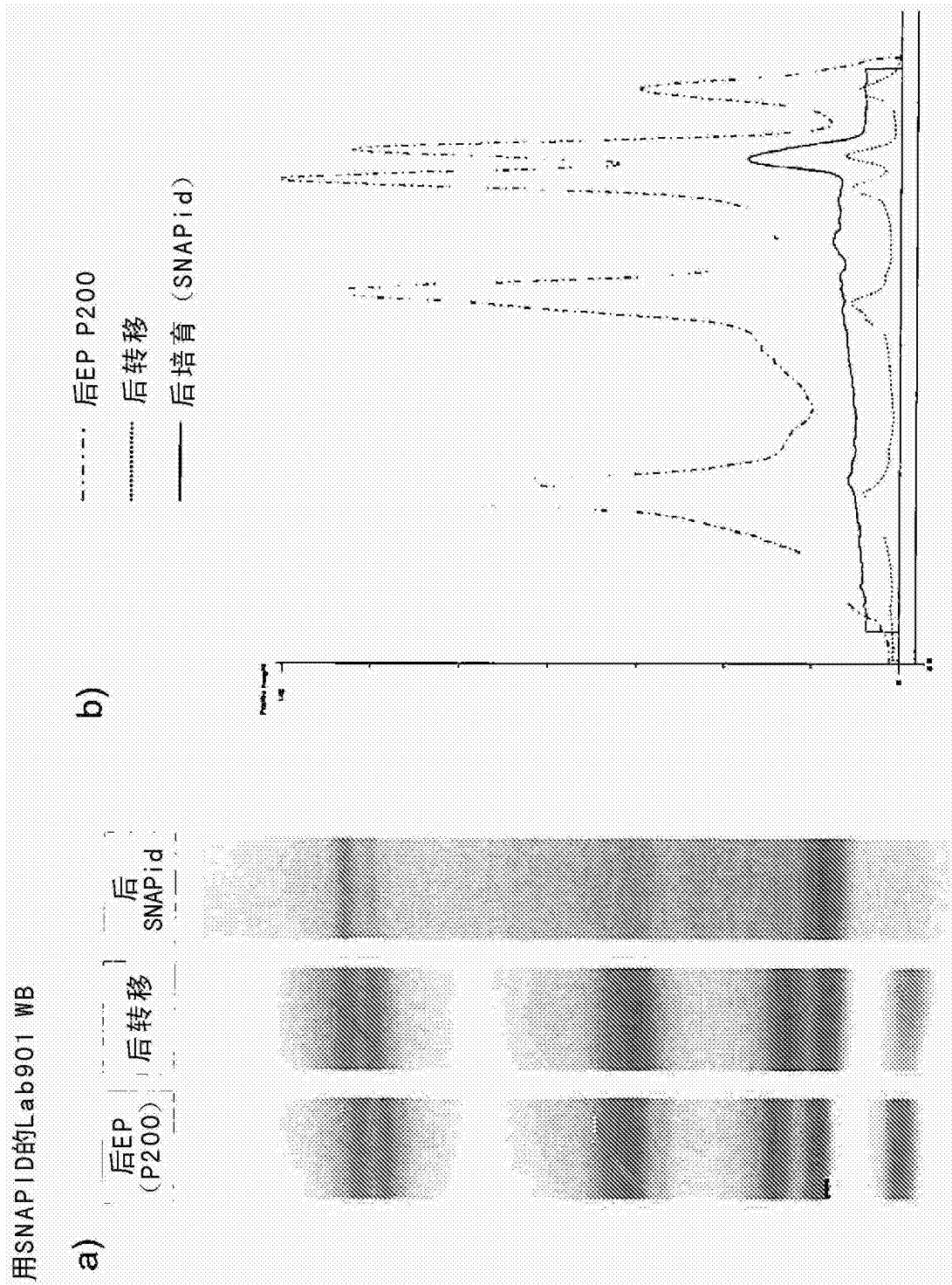


图5

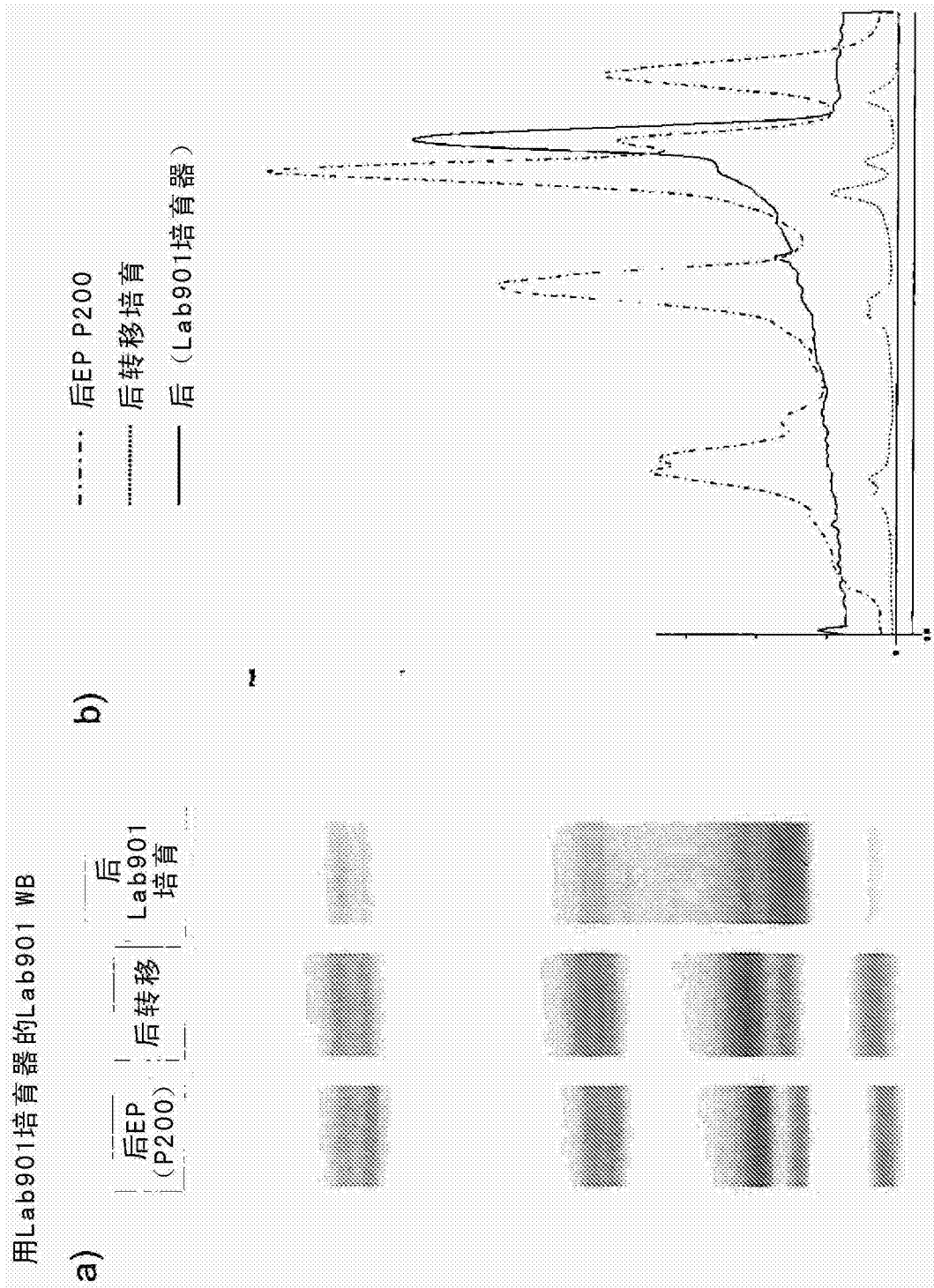


图6

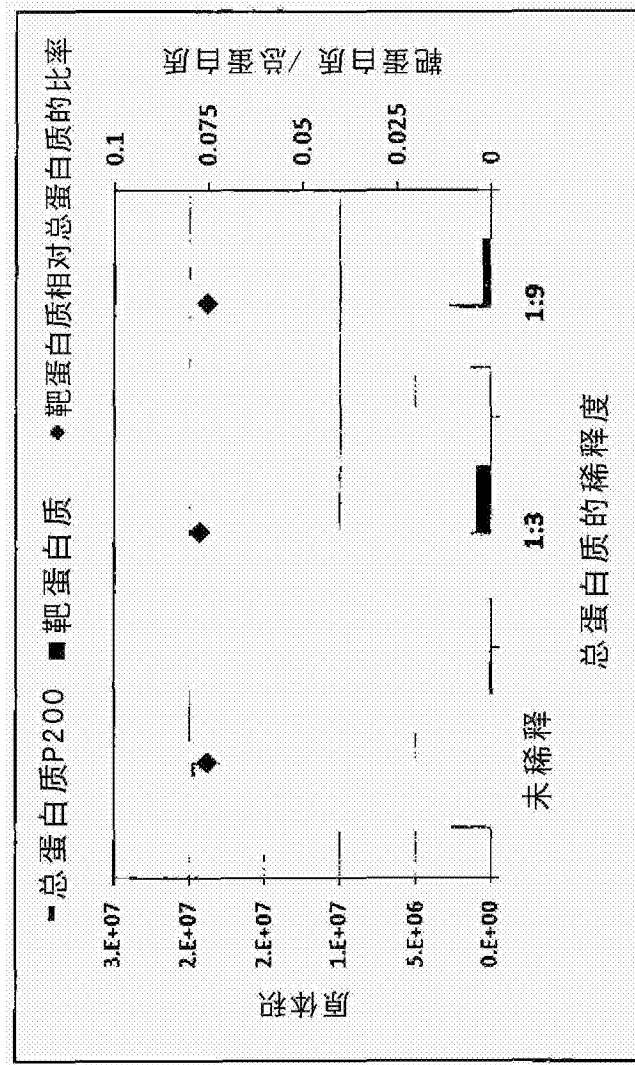


图7

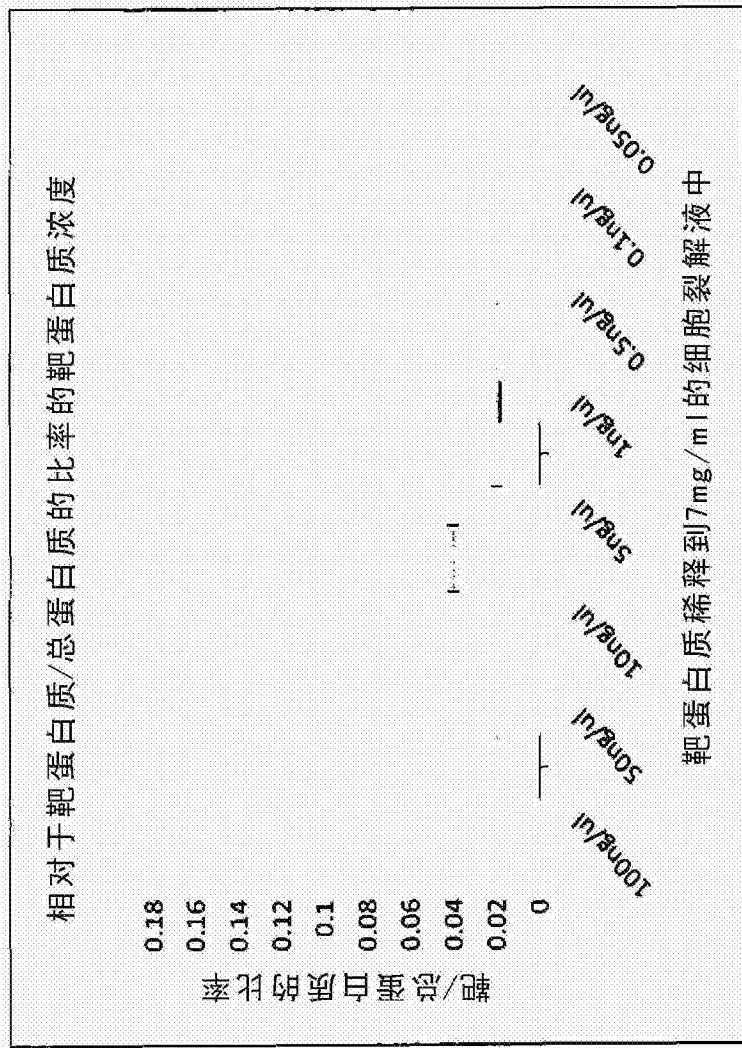


图8

专利名称(译)	western印迹分析技术		
公开(公告)号	CN102918387B	公开(公告)日	2017-05-24
申请号	CN201180025296.7	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)	安捷伦科技有限公司		
[标]发明人	肯尼思G马克拿玛瑞 斯图尔特保尔沃特		
发明人	肯尼思·G·马克拿玛瑞 斯图尔特·保尔沃特		
IPC分类号	G01N27/447 G01N33/53 G01N33/68 G01N1/04		
CPC分类号	G01N27/44726 G01N27/44739 G01N33/6803		
代理人(译)	李晓冬		
优先权	2010008517 2010-05-21 GB 2011000092 2011-01-05 GB		
其他公开文献	CN102918387A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及western印迹分析技术。根据本发明的实施例，本发明提供了进行western印迹分析的方法，所述方法包括依次执行下述步骤：a) 预染色样品中的蛋白质；b) 使用凝胶电泳分离蛋白质；c) 分析分离的蛋白质以确定总蛋白质含量和/或至少一个持家蛋白质含量；d) 将蛋白质转移到至少一个膜上；e) 探测分离的蛋白质以检测靶蛋白质；f) 分析探测的蛋白质以确定靶蛋白质的分子量和/或靶蛋白质的含量。

