

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4705000号
(P4705000)

(45) 発行日 平成23年6月22日(2011.6.22)

(24) 登録日 平成23年3月18日(2011.3.18)

(51) Int.Cl.		F I		
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	

請求項の数 17 外国語出願 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2006-292153 (P2006-292153)	(73) 特許権者	390019585
(22) 出願日	平成18年10月27日(2006.10.27)		ミリポア・コーポレーション
(65) 公開番号	特開2007-127634 (P2007-127634A)		MILLIPORE CORPORATION
(43) 公開日	平成19年5月24日(2007.5.24)		ON
審査請求日	平成18年10月27日(2006.10.27)		アメリカ合衆国01821マサチューセツ州ピレリカ、コンコード・ロード290
(31) 優先権主張番号	60/732, 994	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成17年11月3日(2005.11.3)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
(31) 優先権主張番号	60/795, 452		弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成18年4月27日(2006.4.27)	(74) 代理人	100140523
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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) 【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、

プロットング膜の1つまたは複数の層を支持する多孔性支持体(4)と、多孔性支持体の上部上に配置される多孔性分流器であって、該多孔性分流器はる過材または膜であり、該る過材または膜は、親水性であり、低タンパク質結合特性を有し、その面全体にわたって液体を均一に配給する多孔性分流器(12)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(14)とを含む、デバイス。

【請求項 2】

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。 10

【請求項 3】

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 4】

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

【請求項 5】

デバイスが、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ている、請求項1に記載のデバイス。 20

【請求項 6】

デバイスが、真空マニホールド(8)をさらに含む、真空支援の免疫学的検定を実施するための、請求項1に記載のデバイス。

【請求項 7】

デバイスが、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(10)をさらに含む、分流器は1つまたは複数の膜の上部上にある、真空支援の免疫学的検定を実施するように構成された、請求項1に記載のデバイス。

【請求項 8】

デバイスが、回収マニホールド(22)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た1つまたは複数の膜(10)とをさらに含む、分流器は1つまたは複数の膜の上部上に配置され、デバイスがさらに、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(13)を含む、圧力支援の免疫学的検定を実施するように構成された、請求項1に記載のデバイス。

10

【請求項 9】

デバイスが複数の試薬ウェル(14)を含み、各ウェルが、別々のそれ自身の分流器を有している、請求項1から8のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 10】

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(8)と、真空マニホールド上に配置される多孔性支持体(4)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(10)と、1つまたは複数の膜の上部上に配置される多孔性分流器であって、該多孔性分流器はろ過材または膜であり、該ろ過材または膜は、親水性であり、低タンパク質結合特性を有し、その面全体にわたって液体を均一に配給する多孔性分流器(12)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(14)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。

20

30

【請求項 11】

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10に記載のプロセス。

【請求項 12】

プロセスが、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10に記載のプロセス。

【請求項 13】

プロセスが、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10に記載のプロセス。

40

【請求項 14】

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ング膜上またはプロットング膜中で培養が可能になる、請求項10に記載のプロセス。

【請求項 15】

洗浄液または試薬含有液を、少なくとも1つは検出される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(8)と、真空マニホールド上に配置される多孔性支持体(4)と、多孔性分流器であって、該多孔性分流器はろ過材または膜であり、該ろ過材または膜は、親

50

水性であり、低タンパク結合性を有し、面全体にわたって液体を均一に配給する多孔性分流器（12）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（10）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、

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16】

洗浄液または試薬含有液を、少なくとも1つは検出される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（22）と、多孔性支持体（4）と、支持体の上部上に配置される多孔性分流器であって、該多孔性分流器はろ過材または膜であり、該ろ過材または膜は、親水性であり、低タンパク結合性を有し、その面全体にわたって液体を均一に配給する多孔性分流器（12）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（14）と、正圧ガス源に接続されるその内部中への入口（15）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（13）とを含むデバイス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プロットティング膜（10）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17】

プロセスが複数のウェル（14）を設けることを含み、各ウェルが、別々のそれ自身の分流器を有している、請求項10から16のいずれか一項に記載のプロセス。

【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。

【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

10

20

30

40

50

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

【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。

20

【0007】

米国特許第5,155,049号には、Hoefler 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、その代わりに、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

【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。

40

【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】

プロットング膜上の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

50

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。

【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品質から得られる膜について、殊に有益である。

10

【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、プロット品質膜の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品質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。

【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品質膜を有し、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。

20

【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。

【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。

30

【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。

【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品質膜と、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。

40

【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。

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。

50

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。

【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。

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。

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。

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または取り付けベースを有して形成される。プロットティング膜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、プロットティング膜10の上部上に配置または

10

20

30

40

50

取り付けられる。分流器は、所望なら、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。

【 0 0 2 3 】

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 2 0 に取り付けられるポート 1 8 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 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 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

【 0 0 2 4 】

分流器 1 2 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 1 2 A は、1 つまたは複数のウェル 1 4 内の領域 2 4 中のみ多孔性である。非多孔性の分流器 1 2 の領域 1 7 は、その領域 1 7 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 1 7 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ことによって、あるいは 1 つまたは複数のウェル 1 4 の外側寸法のサイズに一致するように分流器 1 2 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 1 4 の底部に分流器 1 2 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

【 0 0 2 5 】

分流器 1 2 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。

【 0 0 2 6 】

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 × 8 c m から 2 0 × 2 0 c m までの範囲で様々な「標準」サイズで入ってくる。

【 0 0 2 7 】

そのような材料には、これらに限定されないが、T Y V E K (登録商標) または T Y P A R (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 (B i l l e r i c a) の M i l l i p o r e C o r p o r a t i o n 社製の M I L L I S T A K + (登録商標) ろ過材などのセルローズ誘導体材料、微小孔性膜などの膜、P O R E X (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。

30

【 0 0 2 8 】

そのような膜の好ましい孔径は、約 0 . 1 と約 0 . 6 5 マイクロメートルの範囲であり、好ましくは 0 . 2 と約 0 . 4 5 マイクロメートルの範囲であり、より好ましくは約 0 . 2 2 マイクロメートルである。

【 0 0 2 9 】

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、M i l l i p o r e C o r p o r a t i o n 社製の、P V D F から形成される親水性 D U R A P O R E (登録商標) 膜である。他は、同社製の M I L L I P O R E E X P R E S S の親水性 P E S 膜である。

40

【 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

50

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。

【0031】

図3に、標準真空マニホールド30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32を有する。プロットティング膜34は、やはり支持体32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36およびウェル構造38によって覆われる。

10

【0032】

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。

【0033】

図4に示すように、デバイス2A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10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12は、プロットティング膜10の上部上に配置または取り付けられる。分流器12は、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。正圧マニホールドまたはカバー13が、ウェル14および/または分流器12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13は、チューブ17を介して正圧源に接続されるポート15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使用されるよく知られる他の源から送ることができる。

20

【0034】

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18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。

30

【0035】

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。

【0036】

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。

40

【0037】

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。

【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

50

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760mmHg(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100mmHg(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15psi($13.8 \times 10^3 Pa \sim 103 \times 10^3 Pa$)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。

【0041】

図5A~5Cに、ブロック図で通常のプロセスを示す。

20

【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。

【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せられる。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。

40

【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、高価であることができ、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。

50

【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されたこと
10
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するために通常使用される膜である。

【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
20
、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(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
30
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。

【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、
40
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だすことが可能である。

【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、または下げることでもできる。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。

【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
50

セスは、抗原・抗体の結合を崩壊させ、抗体を囲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。

20

逆検定は、本発明によって実施することもできる。

【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、（Loccite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、Loccite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）

40

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1mL（TBS-T中1%カゼインを用いて1:2,000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10分間放置して培養された。133ミリバール（100mmHg）の真空を施して残された抗体溶液を濾過した。TBS-T洗浄液30mLが加えられ、真空下で濾過された（乾燥するまで）。それぞれTBS-T洗浄液30mL、3回

50

TBS-T洗淨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IgG抗体）（TBS-T中1%カゼインを用いて1:1,000に希釈）1mLがウェルに加えられ、真空状態でなく10分間放置して培養された。次いで真空が133ミリパール（100mmHg）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回連続して洗淨溶液、それぞれTBS-T洗淨溶液30mL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（Immobilon（登録商標）Western AP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。

【0058】

10

従来の方法、同じタイプの膜、タンパク質（ERK）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/TBS-T中で膜を遮断する（0.1mL/cm²膜）。
2. 抗ERK抗体（TBS-T中1%カゼインを用いて1:10,000に希釈）を1時間加える（0.1mL/cm²膜）。
3. TBS-Tで5分間4回洗淨する（1.0mL/cm²膜）。
4. 二次抗体（アルカリ性リン酸塩合成抗ウサギIgG；TBS-T中1%カゼインを用いて1:5,000に希釈）を1時間加える（0.1mL/cm²膜）。
5. TBS-Tで5分間4回洗淨する（1.0mL/cm²膜）。
6. Immobilon（登録商標）Western AP試薬を加え、5分間培養する（0.05mL/cm²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

【0059】

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、30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1/10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、バックグランドノイズが、従来方法に比べて著しく減少した。

【図面の簡単な説明】

30

【0060】

【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5A】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5B】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5C】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。

40

【符号の説明】

【0061】

- 2、2A デバイス
- 4 多孔性支持体
- 6 縁部
- 8 マニホールド
- 10、34 プロットティング膜
- 12、36 分流器
- 13 正圧マニホールドまたはカバー
- 14 ウェル

50

- 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

【図1】

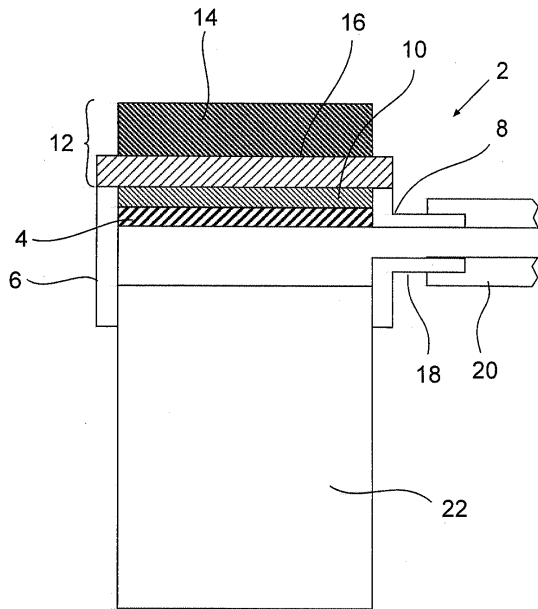


Figure 1

【図2】

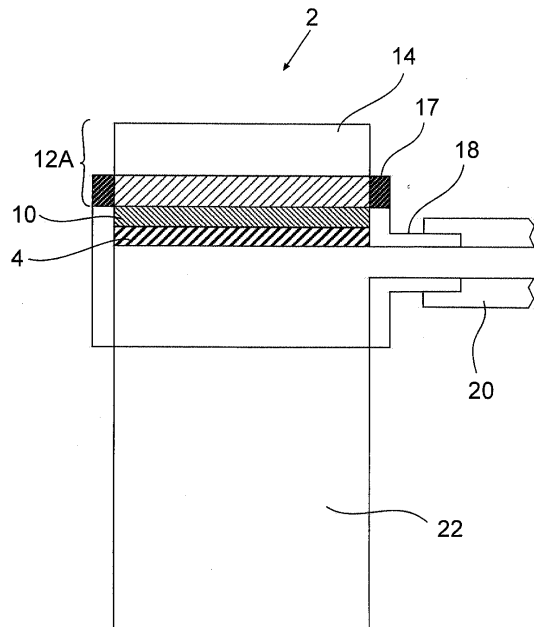


Figure 2

【 図 3 】

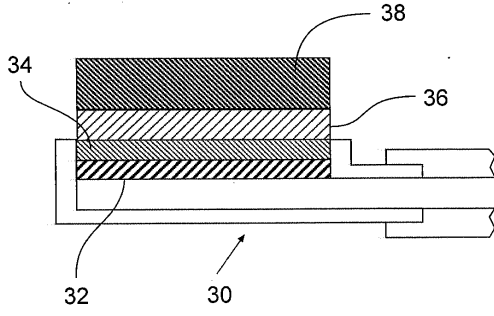


Figure 3

【 図 4 】

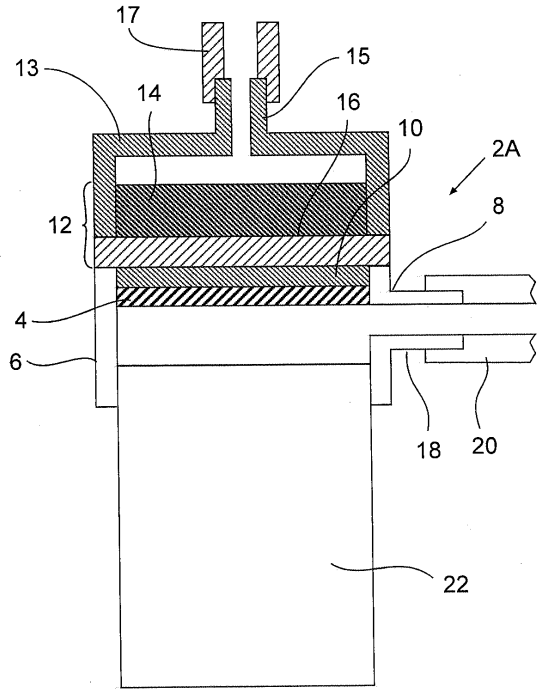


Figure 4

【 図 5 A 】

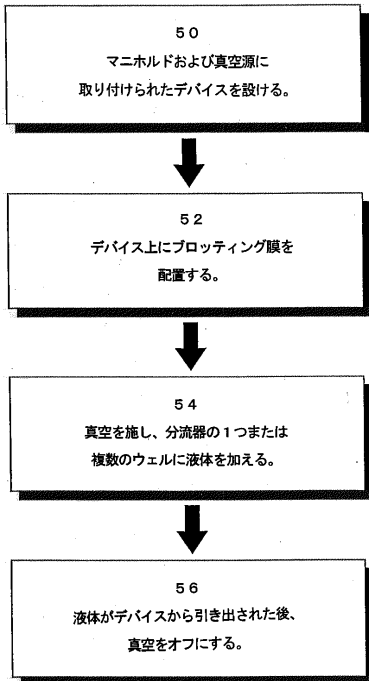


Figure 5A

【 図 5 B 】

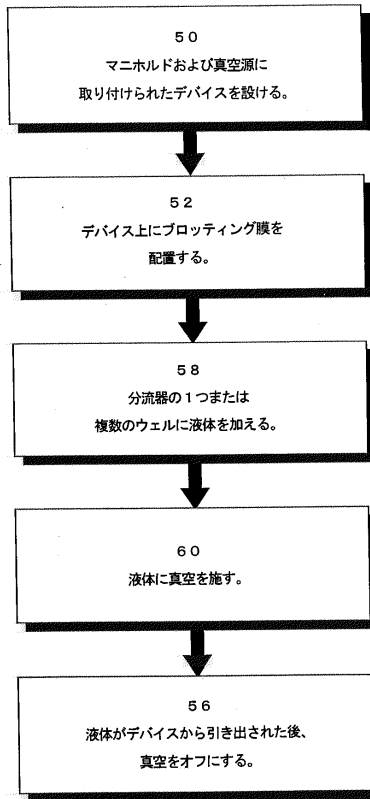


Figure 5B

【図5C】

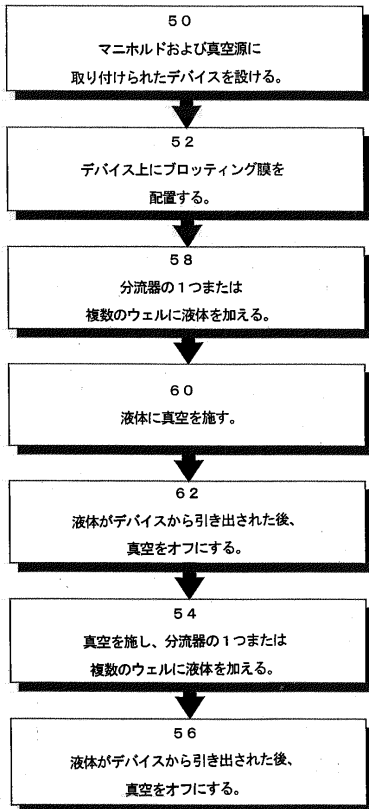
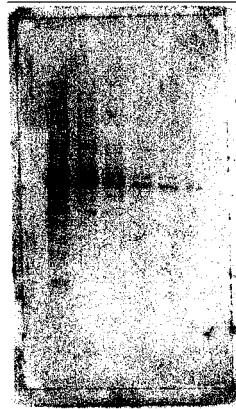
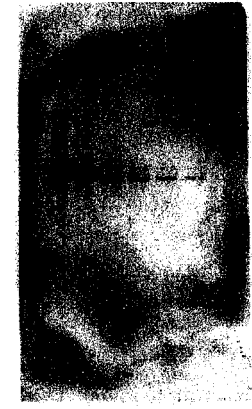


Figure 5C

【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・3
32、ユニット・2

審査官 尾崎 淳史

- (56)参考文献 特表平09-504864(JP,A)
特開平10-290691(JP,A)
特表平01-500958(JP,A)
特開2002-040016(JP,A)
特開昭59-153172(JP,A)
特開平02-187110(JP,A)
特開平04-227032(JP,A)
国際公開第2004/013607(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	免疫测定的产品和工艺		
公开(公告)号	JP4705000B2	公开(公告)日	2011-06-22
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		
当前申请(专利权)人(译)	Millipore公司		
[标]发明人	馬淵昌治 木村浩子 マークエメリツク 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・エメリツク 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	JP2007127634A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种用于检测印迹膜上的一种或多种生物实体的快速，有效且方便的方法。种类代码：A1本发明涉及膜上生物物质的位置，性质或数量。本发明的方法包括用于供应和移除试剂的压力辅助方案，以及使用非常少量的液体以允许从待检测的膜中嵌入的材料清除污染物。阻断，洗涤和抗体结合步骤可在约30分钟内完成，而不会影响印迹质量。该装置包括位于印迹膜下方的多孔载体，位于印迹膜上的转向器，以及允许液体包含在所需区域中并且液体的起始体积较低的转向器。还有几口井，包括：优选地，流量分配器是非结合或低结合亲水膜，例如0.22微米膜。[选图]图1

【图 1】

