

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-163465

(P2007-163465A)

(43) 公開日 平成19年6月28日(2007.6.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 D O 5 4
BO 1 D 57/02 (2006.01)	BO 1 D 57/02	
BO 3 C 5/00 (2006.01)	BO 3 C 5/00 Z	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
	GO 1 N 33/53 T	

審査請求 有 請求項の数 24 O L 外国語出願 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2006-292152 (P2006-292152)	(71) 出願人	390019585 ミリポア・コーポレーション MILLIPORE CORPORATION アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01821、ピレリカ、コンコード・ロード・290
(22) 出願日	平成18年10月27日(2006.10.27)	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/732, 994	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成17年11月3日(2005.11.3)	(74) 代理人	100140523 弁理士 渡邊 千尋
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(31) 優先権主張番号	60/795, 452		
(32) 優先日	平成18年4月27日(2006.4.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/795, 532		
(32) 優先日	平成18年4月27日(2006.4.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

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) 【要約】

【課題】プロットング膜中に含まれる物質を検出し位置決めするためのデバイスおよびプロセスを提供すること。

【解決手段】本発明は、プロットング膜上の化合物を検出するのに有益な装置を対象とする。デバイスは、1つまたは複数のプロットング膜の下にある多孔性支持体と、1つまたは複数のプロットング膜の上にある分流器と、任意選択で、所望の領域で液体を收容し、その液体の始動容積をより低くすることを可能にする、分流器上のウェルとを含む、いくつかの層からなる。好ましくは、分流器が、0.22ミクロン膜など、非結合または低結合で親水性の多孔性膜であり、支持体層が、格子または焼結多孔性材料であることである。分流器および支持体は、一緒に保持され、1つまたは複数の膜のまわりで外皮を形成する。ヒンジ、クリップや他のそのようなデバイスの使用は、そのようにする上で好ましい。

【選択図】 図 1

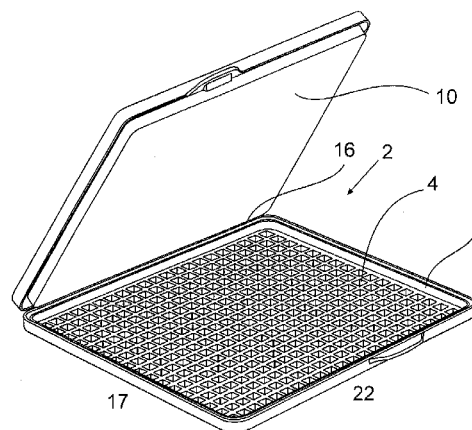


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

多孔性支持体および分流器から形成されるホルダを含み、免疫学的検定を実施するためのデバイスであって、

ホルダが、支持体および分流器を互いに解除可能に固定するための手段を有する、デバイス。

【請求項 2】

支持体および分流器を互いに解除可能に固定するための手段が、ヒンジ、クリップ、ゴムバンド、接着剤、ボールおよびソケット、ピンおよび凹所や、協同して係合するファスナからなる群から選択される形である、請求項 1 に記載のデバイス。

10

【請求項 3】

支持体および分流器を互いに解除可能に固定するための手段が、ヒンジの形である、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4】

分流器が、下側および上側の表面を有し、

上側表面が、分流器の上側表面上に取り付けられた、1つまたは複数のウェルを有する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 5】

分流器が、下側および上側の表面を有し、

上側表面が、分流器の上側表面上に取り付けられた、1つまたは複数のウェルを有し、

1つまたは複数のウェルが、別々に形成される部分である、請求項 1 に記載のデバイス

20

【請求項 6】

分流器が、下側および上側の表面を有し、

上側表面が、分流器の上側表面上に取り付けられた、1つまたは複数のウェルを有し、

1つまたは複数のウェルが、分流器の上側表面の一体で形成される部分である、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 7】

ホルダが、プラスチック、ペーパー、金属、セラミックおよびその組み合わせからなる群から選択される材料から製作される、請求項 1 に記載のデバイス。

30

【請求項 8】

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

【請求項 9】

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る、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 10】

真空マニホールドと、多孔性支持体および分流器から形成されるホルダとを含み、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、

ホルダが、支持体および分流器を互いに解除可能に固定するための手段を有する、デバイス。

40

【請求項 11】

真空マニホールドと、多孔性支持体および分流器から形成される1つまたは複数のホルダとを含み、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、

ホルダが、支持体および分流器を互いに解除可能に固定するための手段を有し、

1つまたは複数の膜が、検定する1つまたは複数の生物学的存在を含み、

1つまたは複数の膜が、多孔性支持体の上部上に取り付けられ、

分流器が、1つまたは複数の膜の上部上に存在する、デバイス。

【請求項 12】

回収マニホールドと、多孔性支持体および分流器から形成される1つまたは複数のホルダ

50

とを含み、圧力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、

1つまたは複数のホルダが、支持体および分流器を互いに解除可能に固定するための手段を有し、

1つまたは複数の膜が、検定する1つまたは複数の生物学的存在を含み、

1つまたは複数の膜が、多孔性支持体の上部上に位置決めされ、

分流器が、1つまたは複数の膜の上部上に存在し、

1つまたは複数の試薬ウェルが、分流器の上部上に取り付けられ、

圧力キャップが、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、

キャップが、その内部への入口を有し、

入口が、正圧ガス源に接続される、デバイス。

10

【請求項13】

分流器が膜である、請求項1に記載のデバイス。

【請求項14】

さらに、試薬回収のために、ホルダの下に回収トレイを含む、請求項10に記載のデバイス。

【請求項15】

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る、請求項10に記載のデバイス。

【請求項16】

さらに、試薬を結合させ溶出させるために、ホルダの下流に吸収剤マトリックスを含む、請求項10に記載のデバイス。

20

【請求項17】

さらに、試薬を結合させ溶出させるために、ホルダの下流に吸収剤マトリックスを含み、

マトリックスが一体構造である、請求項10に記載のデバイス。

【請求項18】

分流器が、下側および上側の表面を有し、

上側表面が、分流器の上側表面上に取り付けられたウェルを有する、請求項1に記載のデバイス。

【請求項19】

30

ホルダが、1つより多い分流器を有し、

それぞれの分流器が、下側および上側の表面を有し、1つまたは複数の分流器のそれぞれの上側表面上に取り付けられた1つのウェルを有する、請求項1に記載のデバイス。

【請求項20】

さらに、ホルダの下に試薬回収のための回収トレイと、1つまたは複数の溝および開口部を有する多孔性支持体とを含み、

前記開口部が、前記回収トレイの周辺部から内側に配置される請求項10に記載のデバイス。

【請求項21】

互いに独立に動作させる2つのホルダが存在する、請求項11に記載のデバイス。

40

【請求項22】

互いに同時に動作させる2つのホルダが存在する、請求項11に記載のデバイス。

【請求項23】

互いに独立に動作させる2つのホルダが存在する、請求項12に記載のデバイス。

【請求項24】

互いに同時に動作させる2つのホルダが存在する、請求項12に記載のデバイス。

【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、2

50

006年4月27日出願の米国仮特許出願第60/795,532号および2005年1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、プロッティング膜中に含まれる物質を検出し位置決めするためのデバイスおよびプロセスに関する。より詳しくは、それは、プロッ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。通常の用途では、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、糖タンパク質およびタンパク質フラグメントの分離、同質性または純度の検証、翻訳修正後の識別および分子量の確認としてのゲル分離への応用である。

10

【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。

20

【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ティング膜に、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、TWEEN（登録商標）界面活性剤を含むトリス（Tris）緩衝食塩水（TBS-T溶液）またはTWEEN（登録商標）界面活性剤を含むリン酸緩衝食塩水（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、全面を洗浄されて、すべての汚染物質、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、処理され、一次抗体に特異的な二次酵素、放射性同位元素、フッ素やビオチン複合体の抗体を用いて培養される。次いで、膜は、再び縦横に洗浄され、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、揺動または他の適切な混合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。

30

40

【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。

【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つの格子から構成される。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

50

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、他が、洗浄ステップ中、膜を通して液体を引き出すために、真空を使用していることを述べている。しかし、彼等は、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、これを軽視している。彼等は、その代わり、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。

10

【0008】

2005年11月3日出願の米国特許出願第60/732,994号に、プロットティング膜の1つまたは複数の層の下に多孔性支持体層と、1つまたは複数のプロットティング膜の上に分流器と、液体を所望の領域で収容し、その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んだいくつかの層から形成されたデバイスを使用することが示唆されている。好ましくは、分流器が、0.22ミクロン膜などの非結合または低結合の多孔性膜であることである。デバイス層が、順番に組み立てられ、次いで真空または加圧ろ過されて、洗浄し膜上の生物学的存在を検出する。

【0009】

プロットティ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、プロットティ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。

20

【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】****【0010】**

一実施形態では、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。デバイスは、下側多孔性支持体層および上側分流器から形成されるプロットティング膜のホルダから構成される。この2つは、ヒンジ、クリップ、ゴムバンド、接着剤、ボールおよびソケット、ピンおよび凹所や協同して係合するファスナまたは他のそのような手段などの方法によって、一緒に保持される。ホルダは、開かれて、1つまたは複数のプロットティング膜が下側層と上側層の間に配置される。次いで、ホルダは、密封され、マニホールド上にまたは専用装置（以下に述べる）中に、どちらかに配置されて、プロットティング膜上のサンプルが処理される。一実施形態では、分流器は、分流器から上側に延在して試薬および洗浄液を保持するためのウェルを形成する外周壁を有する。

30

【0011】

他の実施形態では、ウェルおよび分流器は、2つ以上のサブウェルに分割されて、並行にプロットティング膜または1つのプロットティング膜の下位部分を動作させ、各膜が、通常少なくとも1つの異なる試薬によって処理される。

【0012】

他の実施形態では、分流器は、0.22ミクロン膜などの非結合または低結合の多孔性膜である。

40

【0013】

他の実施形態では、ろ過紙やガラスペーパーなど多孔性の柔軟な層が、プロットティング膜の下で多孔性支持体の上に配置され、したがって分流器膜がプロットティング膜に接触して固定されたとき、この柔軟な層が変形して、確実に、プロットティング膜と分流器の間で完全に勘合して均一な流れになるようにする。

【0014】

他の実施形態では、ホルダは、分流器の上に形成され、試薬および/または洗浄液を、それらの処理中保持するための一体ウェルを有する。

50

【0015】

追加の実施形態は、ホルダを保持し、ろ過ステップを実施するように設計された加圧または真空マニホールドを含む。一実施形態では、マニホールドのふたを閉じたとき、別々のウェルデバイスが、分流器の上部に、直接にまたは接触していずれかで隣接して配置される。他では、ウェルは、分流器の上部上に一体で形成される。

【0016】

他の実施形態では、プロットティング膜上の1つまたは複数の生物学的存在を検出するための迅速、効率的で好都合な方法が提供される。検出は、膜上の生物学的物質の位置、性質や量に関するものに行うことができる。本発明の方法は、試薬をプロットティング膜に供給しそこから除去するために、正圧または真空から選択される圧力支援群を含み、ならびに極めてわずかな容積の液体および試薬を使用して、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、プロットティング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。単に、ホルダを取り出し、それを開き、デバイスを1つまたは複数のプロットティング膜のまわりで閉じたとき、プロットティング膜の下側表面が多孔性支持体に隣接し、プロットティング膜の上側表面が分流器に隣接するように、表面の1つ上に1つまたは複数のプロットティング膜を置く。デバイスは、圧力または真空源を有するマニホールド上またはその中に配置され、プロセスが、開始される。

10

【0017】

本発明の目的は、一緒に保持される多孔性支持体および分流器から形成される1つまたは複数のプロットティング膜のためのホルダを含む、圧力または真空支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスを提供することである。

20

【0018】

本発明の他の目的は、取り外し可能に一緒に保持される多孔性支持体および分流器から形成される1つまたは複数のプロットティング膜のためのホルダを含み、圧力または真空支援の免疫学的検定を実施するための装置であって、分流器が、その上側表面から上方へ延在する壁を有し、それは、分流器の上部上に1つまたは複数の試薬ウェルを形成する、装置を提供することである。

【0019】

本発明の他の目的は、真空マニホールドと、一緒に保持される多孔性支持体および分流器から形成される、1つまたは複数のプロットティング膜のためのホルダとを含み、1つまたは複数のプロットティング膜による真空支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスを提供することである。

30

【0020】

本発明の他の目的は、真空マニホールドと、プロットティング処理するためのホルダと、1つまたは複数の抗体を回収するための手段とを含み、1つまたは複数のプロットティングによる圧力または真空支援の免疫学的検定を実施するための装置を提供することである。

【0021】

本発明の他の目的は、マニホールドと、一緒に保持される多孔性支持体および分流器から形成され、1つまたは複数のプロットティング膜のためのホルダと、分流器の上部上に取り外し可能に搭載される正圧デバイスとを含み、正圧支援の免疫学的検定を実施するためのデバイスを提供することである。

40

【0022】

本発明の他の目的は、1つまたは複数の膜について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、一緒に保持される多孔性支持体および分流器から形成される1つまたは複数のプロットティング膜のためのホルダとを設けるステップであって、1つまたは複数の膜が、検定する1つまたは複数の生物学的存在を含み、1つまたは複数の膜が、多孔性支持体上に配置され、分流器が膜上にあり、1つまたは複数のウェルがホルダの分流器部分の上部上に配置されるステップ。

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、試薬を膜中に浸透させるために真空を加えるステップ。

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込むために真空を加えるステップ。

d. 所望または必要に応じてステップ (b および c) を1つまたは複数の追加の回数繰り返すステップ。

【 0 0 2 3 】

本発明の目的は、洗浄剤または試薬を含有する液体を、その少なくとも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を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。 10

a. 真空マニホールドと、一緒に保持される多孔性支持体および分流器から形成される1つまたは複数のプロットティング膜のためのホルダとを設けるステップ。

b. デバイスが、1つまたは複数のプロットティング膜のまわりで閉じられたとき、1つまたは複数のプロットティング膜の下側表面が、多孔性支持体に隣接し、1つまたは複数のプロットティング膜の上側表面が、分流器に隣接するように、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ホルダ中に配置するステップ。

c. しっかりとホルダを閉じるステップ。

d. 分流器の上部上に液体を加え、液体を、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マニホールド中に引き出すために真空を加えるステップ。 20

【 0 0 2 4 】

本発明の目的は、洗浄剤または試薬含有液体を、その少なくとも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を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、一緒に保持される多孔性支持体および分流器から形成される1つまたは複数のプロットティング膜のためのホルダとを設けるステップ。

b. デバイスが、1つまたは複数のプロットティング膜のまわりで閉じられたとき、1つまたは複数のプロットティング膜の下側表面が、多孔性支持体に隣接し、1つまたは複数のプロットティング膜の上側表面が、分流器に隣接するように、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ホルダ中に配置するステップ。 30

c. しっかりとホルダを閉じるステップ。

d. 分流器の上部上に液体を加え、液体を、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マニホールドに移動するために、分流器に正圧を加えるステップ。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 5 】

図1に示すように、ホルダ2は、2つの部分から構成される。第1または下側の部分が、多孔性支持体4である。好ましいのは、支持体は、マニホールド8 (図3) 上またはその中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ことである。プロットティング膜の1つまたは複数の層 (図示せず) は、1つまたは複数の膜の底部表面が、支持体の上側表面と接触するように、支持体4の上部上に配置される。ホルダ2の第2の部分は、1つまたは複数のプロットティング膜 (図示せず) の上部に接して取り付けられる多孔性分流器10である。 40

【 0 0 2 6 】

上部10および底部4のピースは、少なくとも使用中1つまたは複数の膜をしっかりと所定位置に保持するように、互いに付着することが好ましい。図1および2に示すように、ホルダ2の部分4および10は、ヒンジ16によって一緒に保持される。この実施形態では図に示すように、ヒンジは、2つの部分を一緒に結合する「ライブ (live) 」ヒンジである。あるいは、ヒンジは、別に製作し、接着剤、熱接着や機械的ファスナを使用して取り付けることができるはずである。他の実施形態は、ヒンジを使用せず (図示せず 50

)、クリップ、ゴムバンドや、溝およびつめ、摩擦嵌め合いピン、またはそれぞれの上
 および底部の部分上またはその中にあり、使用中それらを一緒に保持するための同様の形
 のものなど協力して係合するファスナを使用する。他の匹敵する手段が、当業者に明らか
 になり、それらを含むことも意味する。

【0027】

任意選択し好ましいのは、分流器10が、使用中洗浄液および試薬を保持するための1
 つまたは複数いずれかのウェル12を有することができることである。図5に、ホルダ2
 が、2つのウェル12を有して示してある。1つまたは複数のウェル12は、分流器の上
 部表面14の一部分12(図2)として、または分流器10の上部上に単に取り付けるま
 たは配置する別のピース12(図3)として、どちらかで形成することができる。

10

【0028】

図6に、ホルダの他の実施形態が示してある。これは、プラスチックやペーパーなどの薄
 いフィルムを用いて構築されたアセンブリである。それは、自立するのに十分厚く、折り
 曲げるのに十分薄いことが必要である。ホルダ2は、厚さが0.005から0.060in
 (0.13~1.5mm)のフィルムである。フィルムには、ホルダ2の幅方向に走る
 折り曲げライン20がある。フィルムは、ホルダが折り曲げられて閉じられたとき、位置
 が合う2つの開口部を有する。一方の開口部を覆うのは、分流器膜10であり、他方の開
 口部を覆うのは、多孔性支持体4である。多孔性支持体の開口部の外側でそれを囲むのは
 、再封止可能な接着剤など密封または接合材料19である。接合材料19は、取り扱い使
 用中ホルダを一緒に保持する。ホルダ2は、2つのフィルムから構築し、接着剤裏フィル
 ムなど分離する材料を使用することによって、折り曲げライン20の機能をもたらすこと
 ができることは、当業者に明らかにはずである。

20

【0029】

図3に示すように、この実施形態のマニホールド8は、真空源20に付着したポート18
 を有する真空マニホールドである。あるいは、ろ過/洗浄プロセスを駆動するために、ホル
 ダ2の上部の上に与圧空気または他のガス源を有する加圧フードを単に配置することだけ
 で、真空の代わりに正圧を使用することができる(この実施形態では、ポート18は、単
 に与圧空気/ガスのための出口として働く)。ポート18は、多孔性支持体32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、
 または所望の場合マニホールド中に(図示せず)取り付けられ、デバイス2を通して引き出
 された液体を回収する。

30

【0030】

あるいは、廃物回収デバイス22は、廃物ドレインまたは当業者に知られたような他の
 類似のデバイスとすることができる。この例では、ホルダ2は、プラスチックまたは金属
 の格子、プラスチックまたは金属の多孔性焼結シートや、当技術分野でよく知られたよう
 な他の類似のデバイスなどの多孔性支持体構造32から形成される。1つまたは複数のブ
 ロッキング膜34は、やはり支持体32の上部上に配置され、その上には、図2の実施
 形態に関して上記で述べたように、分流器36およびウェル構造38(所望の場合)が存
 在する。図8に、図4に関して以下で述べるマニホールド上に取り付けられる図2のホルダ
 を示す。

40

【0031】

図4に、マニホールド40の好ましい形を示す。マニホールドは、ベース42を有し、ホル
 ダ46(下側支持体48および上側分流器50から形成される)がその上に配置されるド
 レインおよび支持体表面44を有する。この図に示すように、ホルダは、上側および下側
 部分を互いに保持するために、ヒンジ51を使用する。1つまたは複数の膜が、ホルダ4
 6の下側および上側の部分の間に挿入され、次いでそれが閉じられる。ベース42に取り
 付けられるのは、取り外し可能なカバー52である。この実施形態では、カバー52は、
 ベース42に対して上方におよび回転して開閉することができるように、支点53(1つ
 を示す)によってベース42に取り付けられる。カバー52中の開口部55中に別個のウ
 エル54を取り付けることができる。好ましいのはこの図に示すように、ウェル54の底

50

部部分が、開口部 55 中のウェル 54 を保持する、外側に延在するベースまたはへり部 56 を有することである。さらに、ウェル 54 は、その 54 と開口部 55 の間でわずかな摩擦嵌め合いになり、それを所定位置に保持もするような寸法で形作ることができる。カバー 52 は、ふた 54 を回転してベース 42 に対して閉位置にしたとき、ベース 42 上のつめ 60 と勘合し、したがってふた 52 をベース 42 に固定することができるクリップ 58 などのデバイスも有する。さらにこの図に示してあるのは、マニホールド 40 およびプロセスを管理し監視するための任意選択の制御部 62 である。デバイスは、所望の場合、自動液体取扱器その他とともに使用することができる。

【0032】

図 12 に示す追加の実施形態では、マニホールド 90 は、1 つより多いホルダ 94 を処理することができる。ベース 93 は、複数のホルダ 94 をセットするために、複数のステーション 92 を有して設計することができる。また、この実施形態で示すように、各ステーション 92 中のホルダ 94 は、所望の場合、2 つ以上のウェル 98 に分割することができる。マニホールド 90 は、共通の圧力源を有することができ、またはこの図に示すような制御ノブ 96 によってなど各ステーション 92 を個々に圧力制御することができる。カバー 100 は、ホルダすべての上で閉じることができ、またはこの実施形態で示すように、ステーション 92 毎に別個のカバーを有することができる。このフォーマットでは、実験室の処理能力をより高めるように、使用する実験室のベンチスペースが最小になる。

10

【0033】

分流器 10 は、多孔性構造である。分流器は、液体を均等に配給するだけでなく、流量調整器としても働く。それは、完全、均一に液体を配給し、ならびに液体および標本の分子間で適切に相互作用が行われるように、膜中に十分な時間、滞留させることを可能にする。一実施形態では、構造全体が多孔性である。他の実施形態では、図 2 の実施形態とともに使用することができるように、分流器 10 は、1 つまたは複数のウェル 12 内の領域中のみ多孔性である。非多孔性の分流器 10 の領域 16 は、その領域 16 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 16 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 12 の外側寸法のサイズに一致するように分流器 10 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の底部 10 に分流器 10 を液密に密封する(図 2 に示すように)ことによって、そのようにすることができる。

20

30

【0034】

分流器 10 は、その面全体にわたって液体を均等に配給し、真空または圧力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。

【0035】

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 cm から 20 × 20 cm までの範囲で様々な「標準」サイズで入ってくる。分流器は、プロットイング膜全体を覆い、プロットイング膜すべてを通過して試薬が完全に流れるように保証することが好ましい。

40

【0036】

そのような材料には、これらに限定されないが、TYVEK (登録商標) または TYPAR 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 (Billerica) の Millipore Corporation 社製の MF ろ過材などのセルロース誘導体材料、同社製の DURAPORE (登録商標) および MILLIPORE EXPRESS の微小孔性膜、POREX (登録商標) ろ過材の焼結膜などの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。

【0037】

そのような膜の好ましい孔径は、約 0.1 と約 0.65 マイクロメートルの範囲であり、好ましくは 0.2 と約 0.45 マイクロメートルの範囲であり、より好ましくは約 0.

50

22 マイクロメートルである。

【0038】

さらに、好ましい多孔性構造は、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することである。より好ましいのは、それが一般に生物学的材料とともに使用されるので、それが、親水性であり、低タンパク質結合特性を有することである。1つのそのような分流器は、Millipore Corporation社製の、PVDFから形成される親水性DURAPORE（登録商標）膜である。他は、同社製のMILLIPORE EXPRESSの親水性PE5膜である。

【0039】

多孔性支持体4は、簡単なスクリーン、格子（図1および2に示すような）、フロー誘導格子またはPOREX（登録商標）膜などの焼結多孔性構造または織布や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、ガラスのマットまたはペーパー、または1~10ミクロンの微小孔性ろ過材とすることができる。そのような支持体は、ポリマー、ガラス、セラミックや、これらの金属に限定されないが、ステンレス鋼、合金鋼、アルミニウムその他などの金属材料、およびポリエチレン、ポリプロピレン、ポリサルフォン、ポリエーテルサルフォン、スチレン、ナイロンその他などのポリマーから製作することができる。

【0040】

図10に、一連の溝72および開口部74から構成されるフロー誘導格子70の形の多孔性支持体を示す。開口部74は、多孔性支持体70の周辺部から内側に配置される。開口部74は、液体が溝72中に集められ、開口部74を通じて誘導されるように、液体が溝72と連通する。溝72は、使用済みの液体を集めて開口部74に送り、それは、ホルダ（マニホールド）中の廃物チャンバまたは回収トレイ（図示せず）に液体を誘導する。研究者が1つまたは複数の流動体を回収しようとした場合、使用済みの流動体を回収するために、マニホールドの内側で開口部74の下に回収トレイを配置することができる。図11は、使用済みの流動体を溝82中に誘導して開口部84から排出するための格子80の追加の実施形態である。この実施形態は、一連の四角い溝82から構成され、溝72や82および開口部74や84に他の設計を使用できることは、明らかである。所望の成果は、使用済みの流動体を回収トレイへ誘導する開口部または一連の開口部へ使用済みの流動体を誘導することである。

【0041】

支持体4および分流器10の外側縁部は、支持体4と同じ材料から製作することができる。一体ヒンジを使用するとき、それは、ポリエチレン、ポリプロピレン、高分子弾性体や、ABS、K樹脂その他などの衝撃緩和材料の1つなど、可撓性材料から製作する必要がある。別個のヒンジ、クリップ、ゴムバンド、接着フィルムや他の固定手段を使用するとき、それらは、所望のように、金属、プラスチックや高分子弾性体から製作することができる。

【0042】

図9Aおよび9Bに、分流器110が単一（示すように）または好ましくは複数のウェルフォーマット101の形である、本発明の他の実施形態を示す。支持体112は、分流器110の1つまたは複数のウェル114の1つまたは複数の壁に取り付けられる、別個のピース111として形成される。これは、使用中構造を着脱可能に一緒に保持するために、摩擦嵌め合いまたは好ましくはスナップ式とすることができる。あるいは、分流器110の底部サイドに、または支持体112を収容するピース111の上部表面に、それらを一緒に保持するために、接着パッド（図示せず）などの接着剤を取り付けることができる。放出口116を有した格子は、支持体112を収容するピース111の底部に位置決めされる。膜118は、支持体112の上部上に置かれ、次いでそれは、分流器110に取り付けられる。次いで、ウェルデバイス101が、システムを通して移動する流動体を集めるための廃物トレイ、複数のウェルのプレートや一連の1つまたは複数のチューブ（図に示すように）などの収集デバイスを有する加圧または真空マニホールド120上にまた

10

20

30

40

50

はその中に配置される。

【0043】

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、過去に行われたような表面における二次元相互作用のみでなく、深さ方向至る所で分子すべての三次元相互作用を可能にするように、膜の内側表面領域に広くアクセスするために、それらすべては、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。

【0044】

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、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。

10

【0045】

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を通じて液体を移動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。

【0046】

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る真空または正圧源に依存して変えることができる。

【0047】

一般に、使用できる真空は、100から760 mmHg (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、約100 mmHg (133ミリバール)の真空のものを使用する。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) HTS 真空マニホールドが含まれる。

20

【0048】

一般に、正圧は、約2から15 psi (13.8×10^3 Pa ~ 103×10^3 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。

30

【0049】

本発明によるデバイスを使用するには、ホルダを取り出し、それを開いて、デバイスを1つまたは複数のプロットティング膜のまわりで閉じたときプロットティング膜と分流器の間に気泡がないように、プロットティング膜の下側表面が多孔性支持体に隣接し、プロットティング膜の上側表面が分流器に隣接するように、表面の1つ上に1つまたは複数のプロットティング膜を配置するだけである。これら2つの表面間の気泡によって、流れが生じない領域が発生し得る。デバイスは、圧力源 (真空または正圧) を有するマニホールド上またはその中に配置される。好ましいのは、1つまたは複数のプロットティング膜を予め湿らせてあることである。圧力 (真空または正圧) を加え、使用する場合、洗浄液や試薬などの液体を分流器の上部上または1つまたは複数のウェル中にセットする。圧力は、液体がデバイスおよび1つまたは複数の膜を通過して移動するまで継続される。次いで、圧力を止める。

40

【0050】

1つより多いプロットティング膜を使用するとき、それらは、互いの上部上に連続して配置することができ、同じ望ましい試薬を含む十分な液体が、1回のプロセスステップで複数の層を通過して容易に移動することができる。一般に、1つより多い層を使用するとき、2から10の層を使用することが好ましく、好ましくは1回に2から5の層である。ある

50

いは、複数のサブウェルを有する分流器を使用し、互いに並行に1つより多いプロットティング膜を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。また、それぞれが1つまたは複数のサブウェルを有した、2つ以上の別個のホルダを取り付けることができる。所望の場合、隣接したウェル中に複数の層を使用することさえできる。2つ以上のホルダを使用する場合、それらは、所望なら互いに独立に動作させ、または一緒に動作させることができる。

【0051】

液体は、圧力源をオフにして、または1つまたは複数の膜中に液体を浸透させるように少しの間だけ圧力源をオンにして、どちらかで加えることができ、培養を可能にする（一次または二次抗体について必要になることがある）。次いで、圧力は、液体を除去するおよび/またはそれをその後使用する他に置き換えるために、オンにされる。好ましいのは、洗浄中、真空状態のままにし、残された洗浄剤を順次加えることである。

10

【0052】

任意選択で、望む場合、デバイスの下に、好ましくはマニホールド自体中にまたはその下流に回収容器70を配置することができる。次いで、それは、高価であることがあり、回収して将来の検定に使用するためにリサイクルすることができる1つまたは複数の非結合試薬を回収するために、使用することができる。この容器は、プロットティング膜のそれぞれの部分と液体が連通し位置合わせされた複数のチャンバに分割することもできる。図7に、中央回収ポイント72および支持体4の下流表面と嵌合するための支持リブ74を有する1つのそのような回収容器70を示す。他の実施形態を使用することもできる。

20

【0053】

追加または代替実施形態として、ホルダの下で下流流路中に、高価な1つまたは複数の非結合試薬を可逆的に結合させることができる吸収剤マトリックスを配置することができる。このマトリックスは、パッド、プラグやペーパーシートなど、一体構造であることが好ましく、それは、プロットティング膜およびホルダを通過する液体すべてがマトリックスを通過するように、配置される。次いで、それは、取り外されて試薬を溶出させ、または所望なら、それは、プロットティング膜の試験終了後そのまま結合試薬を溶出させる、どちらかとすることができる。

【0054】

本発明のデバイスとともに他のプロセスを使用することもできる。

30

【0055】

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ティングされたことによって、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、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ティングするために通常使用される膜である。

40

【0056】

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、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。

50

【0057】

電気泳動の結果の写し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) によって、またはゲルのプロットを乾燥することによって、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。

【0058】

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、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出すことが可能である。

【0059】

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、または下げることもできる。これは、デバイス、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）やシステム中で使用される液体を加熱することによって、達成することができる。

【0060】

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。

【0061】

標準のウェスタンプロットでは、抗原または目標は、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、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。逆検定は、本発明によって実施することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0062】

10

20

30

40

50

- 【図 1】本発明によるデバイスの第 1 の実施形態を示す斜視図である。
- 【図 2】本発明によるデバイスの第 2 の実施形態を示す斜視図である。
- 【図 3】マニホルド中に取り付けられた本発明によるデバイスを示す断面図である。
- 【図 4】本発明によるマニホルド中のデバイスの実施形態を示す斜視図である。
- 【図 5】本発明によるデバイスの第 3 の実施形態を示す斜視図である。
- 【図 6】本発明によるデバイスの第 4 の実施形態を示す斜視図である。
- 【図 7】本発明による試薬回収デバイスの実施形態を示す斜視図である。
- 【図 8】本発明によるマニホルド中のデバイスの好ましい実施形態を示す斜視図である。
- 【図 9 A】本発明のデバイスの他の実施形態を示す図である。
- 【図 9 B】本発明のデバイスの他の実施形態を示す図である。 10
- 【図 10】多孔性支持体の実施形態を示す斜視図である。
- 【図 11】多孔性支持体の代替実施形態を示す斜視図である。
- 【図 12】本発明の実施形態を示す斜視図である。
- 【符号の説明】
- 【0063】
- 2、46、94 ホルダ
- 4 多孔性支持体、底部
- 6 縁部
- 8、40、90 マニホルド
- 10 多孔性分流器、上部、分流器、分流器膜 20
- 12、54、98、114 ウェル
- 14 上部表面
- 16 ヒンジ、領域
- 18 ポート
- 19 接合材料
- 20 折り曲げライン、真空源
- 22 廃物回収デバイス
- 32 多孔性支持体、多孔性支持体構造
- 34 プロットティング膜
- 36、110 分流器 30
- 38 ウェル構造
- 42、93 ベース
- 44 ドレインおよび支持体表面
- 48 下側支持体
- 50 上側分流器
- 51 ヒンジ
- 52 カバー、ふた
- 53 支点
- 55、84 開口部
- 56 へり部 40
- 58 クリップ
- 60 つめ
- 62 制御部
- 70 フロー誘導格子、多孔性支持体、回収容器
- 72 溝、中央回収ポイント
- 74 開口部、支持リブ
- 80 格子
- 82 溝
- 92 ステーション
- 96 制御ノブ 50

- 1 0 0 カバー
- 1 0 1 ウェルフォーマット、ウェルデバイス
- 1 1 1 ピース
- 1 1 2 支持体
- 1 1 6 放出口
- 1 1 8 膜
- 1 2 0 加圧または真空マニホールド

【図1】

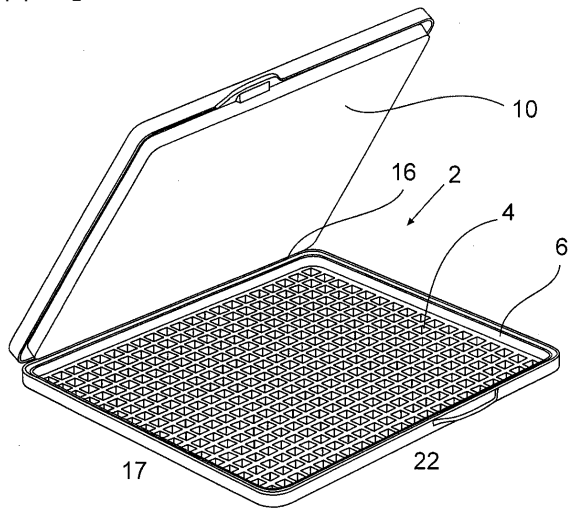


Figure 1

【図2】

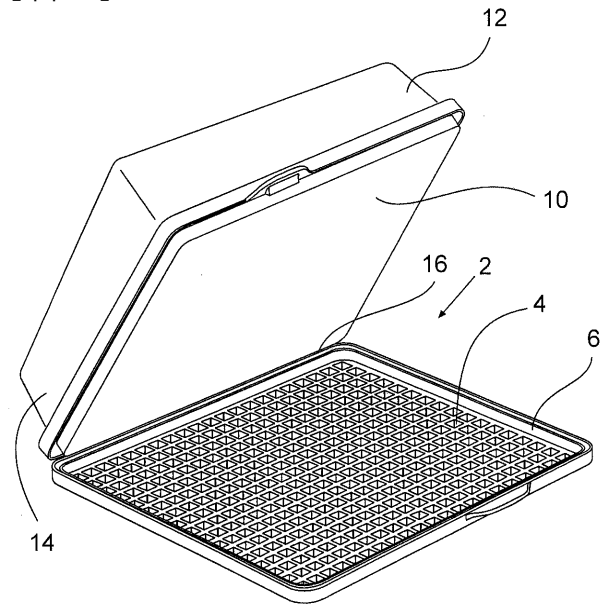


Figure 2

【 図 3 】

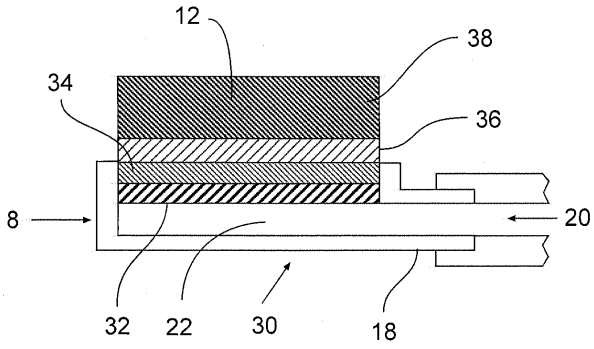


Figure 3

【 図 4 】

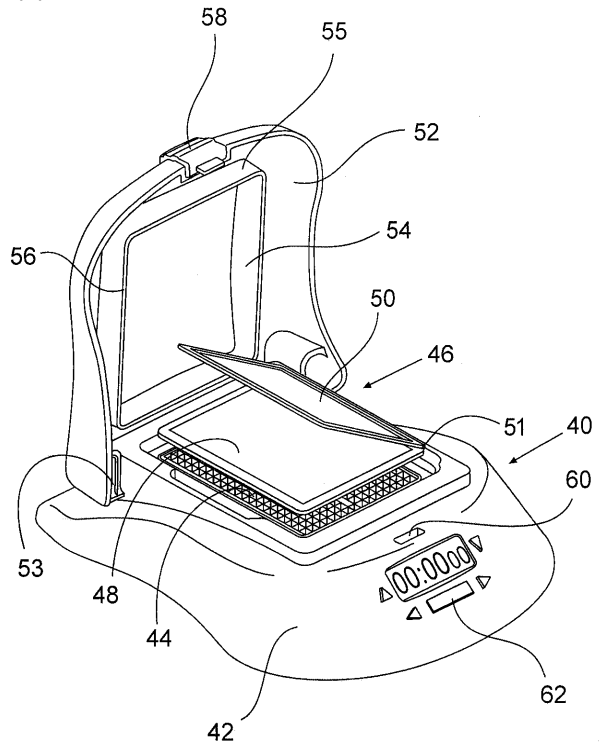


Figure 4

【 図 5 】

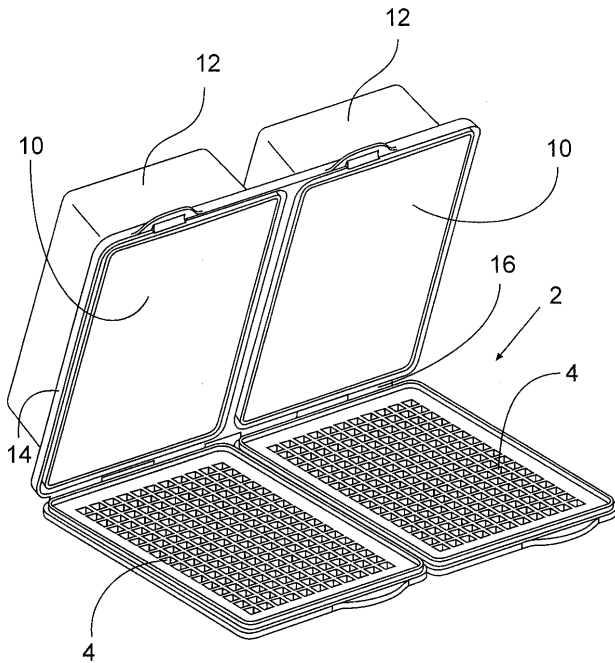


Figure 5

【 図 6 】

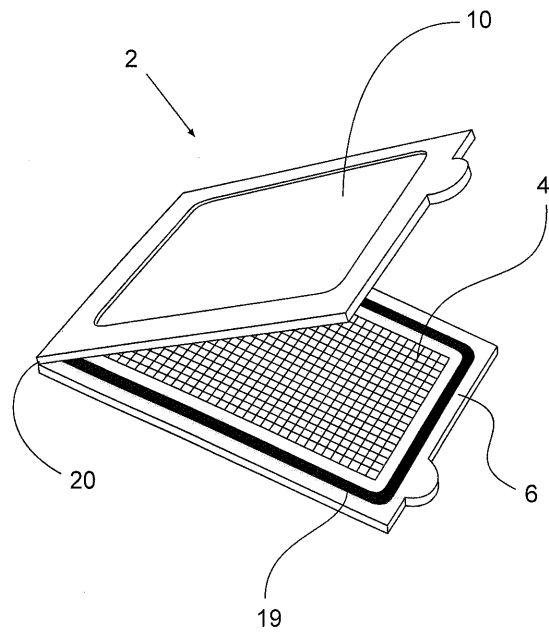


Figure 6

【 図 7 】

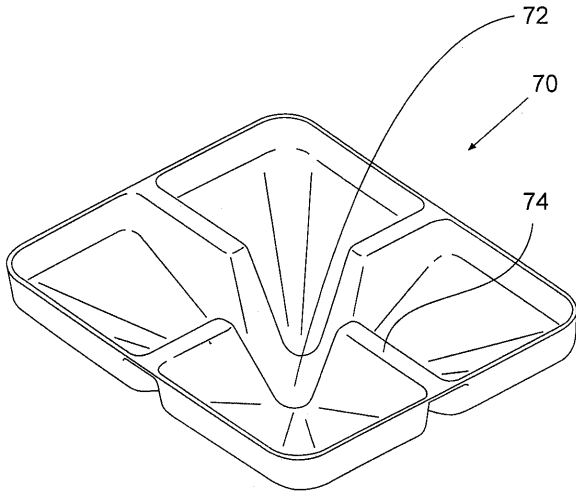


Figure 7

【 図 8 】

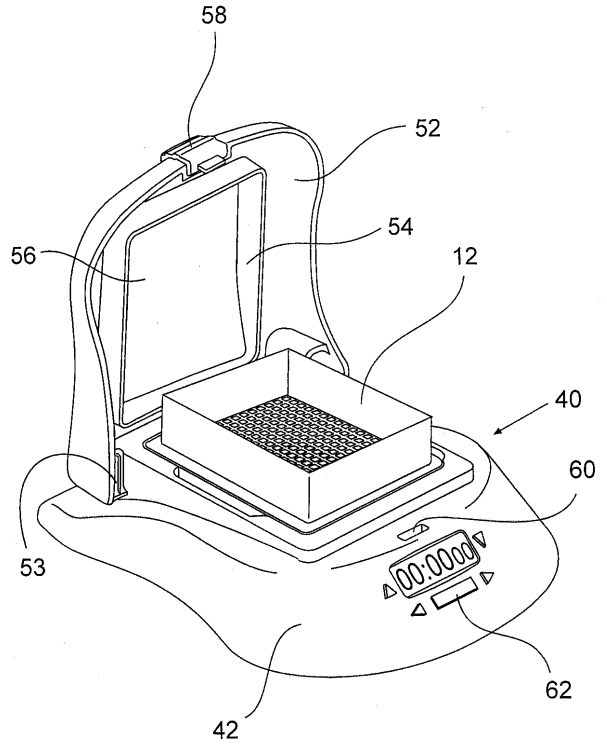


Figure 8

【 図 9 A 】

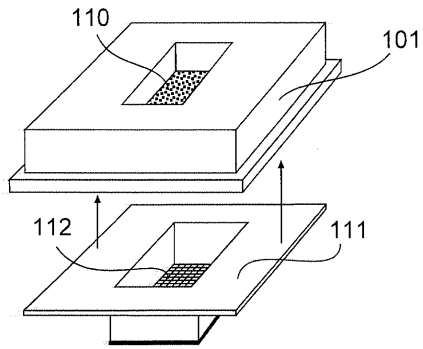


Figure 9A

【 図 9 B 】

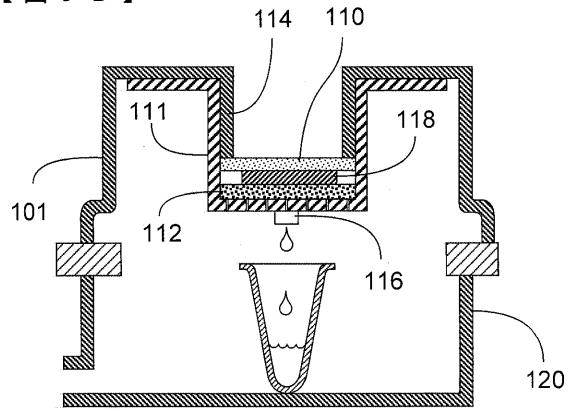


Figure 9B

【図 10】

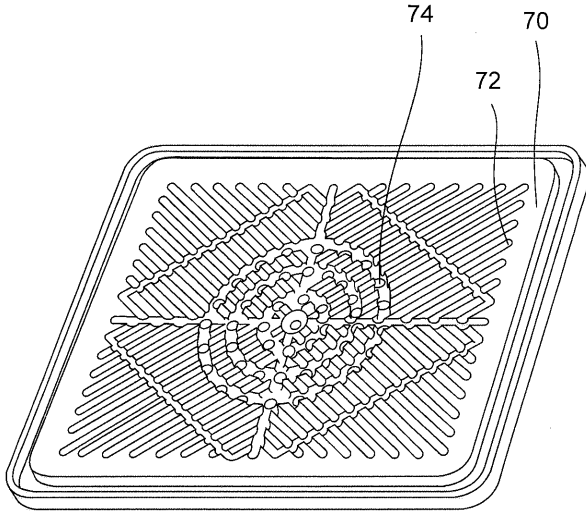


Figure 10

【図 11】

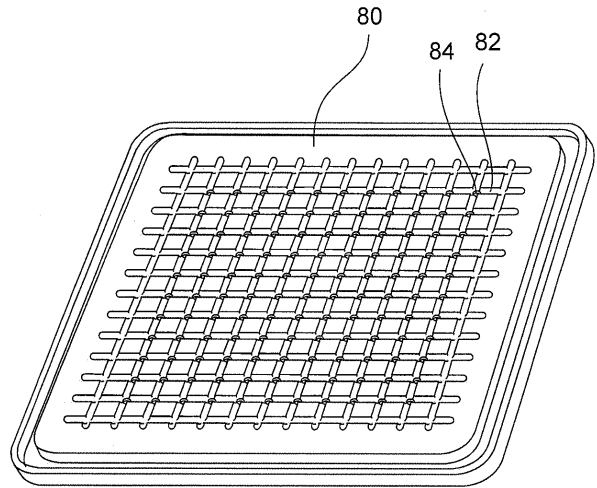


Figure 11

【図 12】

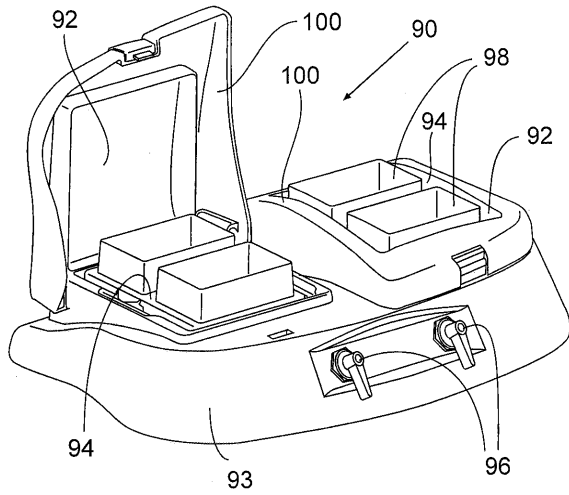


Figure 12

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・エメリック
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
- Fターム(参考) 4D054 FB20

【外国語明細書】

Specification

Title of Invention

IMMUNOASSAY PRODUCT AND PROCESS

Cross-Reference to Related Applications

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/795,452, filed on April 27, 2006, U.S. Provisional Application No. 60/795,532, filed on April 27, 2006 and U.S. Provisional Application No.: 60/732,994, filed on November 3, 2005.

The invention relates to a device and process for the detection and position of substances that are contained in a blotting membrane. More particularly, it concerns a technique for applying reagents and wash solutions to a blotting membrane to accomplish this detection quickly via the use of vacuum or positive pressure.

Background of the Invention

The use of gel electrophoresis is currently the ubiquitous technique for the separation of biological materials. Nonbiological materials can also be separated using gels or other chromatographic supports as well, but the scope of effort with regard to biologicals is greater. Typical applications include separation of nucleic acid fragments of various sizes either in the context of sequence determination; in the detection of polymorphisms; or verification of sizes in other contexts. Also frequently conducted are separations of proteins, glycoproteins, protein fragments and application of gel separations as verification of homogeneity or purity, identification of post translational modifications and confirmation of molecular weight.

In all of these procedures, mixed samples of biological entities are applied to electrophoretic gels and the components are separated by application of an electric field across the gel. Regardless of the manner in which the gel is developed, the resulting pattern of migration of the substances contained in the sample must be detected in some manner.

To conduct this detection, typically the gel support is contacted with a blotting membrane to which the substances are transferred in the same pattern in which they appeared on the gel. The "spots" are then detected, at a minimum, by blocking the membrane with a protein or detergent solution to reduce non-specific binding (which otherwise leads to a high level of noise and low level of detection). Typical blocking agents include casein, bovine serum albumin (BSA), non-fat dry milk (generally about 1-5%) in a Tris buffer saline solution with TWEEN® surfactant (TBS-T solution) or

phosphate buffer saline solution with TWEEN® surfactant (PBS-T solution). The biological entity is then incubated with an antibody specific for the antigen on the membrane. The membrane is then extensively washed to remove any contaminants, unbound blocking proteins or antibodies and the like. The membrane is then treated and incubated with a secondary enzyme-, radioisotope-, fluorfluor-, or biotin-conjugated antibody specific for the primary antibody. The membrane is then extensively washed again to remove any unbound secondary antibody. Then a detection reagent, generally a chromogenic, chemiluminescent, fluorescent, radiological, or streptavidin-labeled material, is applied which either binds to, or is a substrate of the enzyme-conjugate. Lastly, the appropriate detection device is used to determine the presence, absence, position, quantity, etc. of the biological entity. The last six steps generally take from 3-6 hours to overnight depending on the speed of the reaction between the selected reagents, the membrane and the biological entity. The process requires multiple incubation periods of the membrane on a rocking or other suitable mixing platform. It is a lengthy process that most researchers dislike and which consumes (wastes) a large volume of reagents.

Some researchers have suggested the use of the capillary action of an absorbent material such as filter paper placed below the membrane to draw the remaining fluids through the membrane and improve the speed of the process especially the washing steps.

US 5,155,049 mentions a system called the Hybrid-Ease™ hybridization chamber marketed by Hoefer Scientific Instruments. This chamber is comprised two grids between which the membrane is sandwiched. The grid plates are snapped into position surrounding the membrane, and syringes fitted into the open space created by the grids. One syringe is used to apply reagents and wash, and the other to withdraw excess. The system requires large volumes of liquid in order to operate, is cumbersome to employ and is still quite time consuming. It also mentions that in some particular assays, such as ELISA assays, in small volume wells (such as 96 well microtiter plate), others have used vacuum to draw liquids through a membrane in a washing step. However, they discount this effort as it is only available in small volume applications and still is uncontrollable. They suggest instead that the better method is to use a manual press having the membrane on top of a filter paper and cover layer and then pressing the membrane sandwich between two plates to squeeze the liquid through the membrane and into the paper.

In USSN 60/732,994, filed November 3, 2005 it is suggested that one use a device formed of several layers including a porous support layer below the one or more layers of blotting

membrane, a flow distributor above the blotting membrane(s) and a well on the flow distributor to contain the liquid to the desired area and to allow for lower starting volumes of such liquid. Preferably, the flow distributor is a non-binding or low binding porous membrane such as a 0.22 micron membrane. The device layers are assembled in order and then subjected to vacuum or pressure filtration to wash and detect the biological entities on the membrane.

It is clear that a more efficient method for detection of the biological materials or entities on blotting membranes is required. The present invention permits a more effective and efficient detection of biological entities in a blotting membrane.

Summary of the Invention

In one embodiment, the invention is directed to an apparatus useful in conducting the method of the invention. The device is comprised of a blotting membrane holder formed of a lower porous support layer and an upper flow distributor. The two are held together by a method such as by a hinge, clips, elastic bands, adhesives, ball and socket, pins and recesses, or cooperatively engaging fasteners or other such means. The holder is opened and one or more blotting membranes are placed between the lower and upper layers. The holder is then sealed and placed either onto a manifold or into a special apparatus (described below) to process the samples on the blotting membrane. In one embodiment, the flow distributor has an outer perimeter wall extending upwardly from the flow distributor to form a well to hold reagents and washing fluids.

In another embodiment the well and flow distributor are subdivided into two or more subwells to run parallel blotting membranes or subparts of one blotting membrane, each membrane is typically processed with at least one different reagent.

In another embodiment, the flow distributor is a non-binding or low binding porous membrane such as a 0.22 micron membrane.

In another embodiment, a porous pliable layer, such as a filter paper or glass paper, is placed below the blotting membrane and above the porous support so that when the flow distributor membrane is secured against the blotting membrane the pliable layer deforms to insure a complete mating and uniform flow between the blotting membrane and the flow distributor.

In a further embodiment the holder has an integral well formed above the flow distributor to hold reagents and /or wash fluids during the processing of them.

Additional embodiments include a pressure or vacuum manifold designed to retain the holder and conduct the filtration steps. In one embodiment, a separate well device is placed adjacent to the top of the flow distributor, either directly or through contact when the manifold lid is closed. In another, the well is integrally formed on top of the flow distributor

In another embodiment a rapid, efficient and convenient method to detect one or more biological entities on a blotting membrane is provided. The detection can relate to the position, nature or amount of the biological substance on a membrane. The invention method involves a pressure assisted regimen, selected from positive pressure or a vacuum for the supply and removal of reagents to and from the blotting membrane and permits washing of the contaminants from substances embedded in the membrane that are to be detected using very low volumes of liquid and reagents. This method enables completion of the blocking, washing and antibody binding steps in about 30-45 minutes without compromising blot quality. One simply takes a holder, opens it and places the blotting membrane(s) on one of the surfaces such that the lower surface of the blotting membrane is adjacent the porous support and the upper surface of the blotting membrane is adjacent the flow distributor when the device is closed around the membrane(s). The device is placed on or in a manifold having a pressure or vacuum supply and the process is commenced.

It is an object of the present invention to provide a device for conducting pressure or vacuum assisted immunoassays comprising a holder for the one or more blotting membranes formed of a porous support and a flow distributor which are held together.

It is another object of the present invention to provide an apparatus for conducting pressure or vacuum assisted immunoassays comprising a holder for the one or more blotting membranes formed of a porous support and a flow distributor which are removably held together and the flow distributor having an upwardly extending wall from its upper surface which forms one or more reagent wells on top of the flow distributor.

It is another object of the present invention to provide a device for conducting vacuum assisted immunoassays of one or more blotting membranes comprising a vacuum manifold and a holder for the one or more blotting membranes formed of a porous support and a flow distributor which are held together.

It is another object of the present invention to provide an apparatus for conducting pressure or vacuum assisted immunoassays of one or more blots comprising a vacuum manifold and a holder for processing the blots and a mean of collecting one or more of the antibodies.

It is a further object of the present invention to provide a device for conducting positive pressure assisted immunoassays comprising a manifold, a holder for one or more blotting membranes, the holder being formed of a porous support and a flow distributor which are held together and a positive pressure device removably mounted on top of the flow distributor.

It is a further object of the present invention to provide a process for conducting vacuum assisted immunoassays on one or more membranes comprising the steps of:

- a. providing a vacuum manifold, a holder for the one or more blotting membranes formed of a porous support and a flow distributor which are held together, one or more membranes containing one or more biological entities to be assayed, the membrane(s) being placed on the porous support, a flow distributor being on top of the membrane and one or more wells placed on top of the flow distributor portion of the holder,
- b. adding one or more reagents to the one or more wells and applying a vacuum to pull the reagents into the membrane, and
- c. adding one or more washing agents to the one or more wells and applying a vacuum to pull the washing agents and any unbound reagents through the flow distributor, membrane and porous support and into the vacuum manifold and
- d. repeating steps (b and c) one or more additional times as desired or required.

It is an object of the present invention to provide a process of passing a wash or reagent-containing liquid through one or more blotting membranes containing one or more biological entities, at least one of which is to be detected wherein the process comprises:

- a. providing a vacuum manifold, a holder for the one or more blotting membranes formed of a porous support and a flow distributor which are held together,
- b. placing the one or more blotting membranes containing the one or more biological entities into the holder such that the lower surface of the blotting membrane(s) is adjacent the porous support and the upper surface of the blotting membrane(s) is adjacent the flow distributor when the device is closed around the membrane(s),
- c. securely closing the holder, and

- d. adding a liquid to the top of the flow distributor, and applying a vacuum to draw the liquid through the flow distributor, blotting membrane(s) and porous support into the manifold.

It is an object of the present invention to provide a process of passing a wash or reagent-containing liquid through one or more blotting membranes containing one or more biological entities, at least one of which is to be detected wherein the process comprises:

- a. providing a manifold, a holder for the one or more blotting membranes formed of a porous support and a flow distributor which are held together,
- b. placing the one or more blotting membranes containing the one or more biological entities into the holder such that the lower surface of the blotting membrane(s) is adjacent the porous support and the upper surface of the blotting membrane(s) is adjacent the flow distributor when the device is closed around the membrane(s),
- c. securely closing the holder, and,
- d. adding a liquid to the top of the flow distributor, and applying a positive pressure to the flow distributor to move the liquid through the flow distributor, blotting membrane(s) and porous support to the manifold.

Detailed Description of the Invention

As shown in Figure 1, the holder 2 is comprised of two portions. The first or lower portion is a porous support 4. Preferably the support is formed with an edge 6 or mounting piece that is designed to fit into or onto a manifold 8 (Figure 3). One or more layers of a blotting membrane (not shown) are placed on top of the support 4 such that the bottom surface of the membrane(s) is in contact with the support's upper surface. The second portion of the holder 2 is a porous flow distributor 10 that is applied against the top of the blotting membrane(s) (not shown).

The top 10 and the bottom 4 pieces are preferably attached to each other at least during use to hold the one or more membranes securely in place. As shown in Figures 1 and 2 the two portions 4 and 10 of the holder 2 are held together by a hinge 16. As shown in this embodiment the hinge is a "live" hinge that bonds the two portions together. Alternatively, the hinge could be made separately and attached using adhesives, heat bonds or mechanical fasteners. Other embodiments use no hinge (not shown) and use clips, elastic bands or cooperatively engaging fasteners such as a slot and detent, friction fit pin or the like form on or in the respective top and bottom portions to hold them together during use. Other comparable means will be obvious to one of skill in the art and it is meant to include them as well.

Optionally and preferably the flow distributor 10 may either have one or more wells 12 for holding washing fluids and reagents during use. In Figure 5, the holder 2 is shown with two wells 12. The well(s) 12 may either be formed as part of the top surface 14 of the flow distributor 10 (Figure 2) or as a separate piece 12 (Figure 3) which is simply attached or placed on top of the flow distributor 10.

In Figure 6 is another embodiment of the holder. This is an assembly constructed with thin films such as of plastic or paper. It should be thick enough to be self-supportive and thin enough to be folded. The holder 2 is a film having a thickness from 0.005" to 0.060". The film has a fold line 20 running the width of the holder 2. The film has two openings that are aligned when the holder is folded closed. Covering one opening is the flow distributor membrane 10 and covering the other opening is a porous support 4. Outwardly and circumscribing the porous support opening is a sealing or joining material 19, such as a resealable adhesive. The joining material 19 holds the holder together during handling and use. It would be obvious to one skilled in the art that the holder 2 could be constructed from two films and having a separated material such as an adhesive back film provide the function of the fold line 20.

As shown in Figure 3, the manifold 8 in this embodiment is a vacuum manifold which has a port 18 that is attached to a source of vacuum 20. Alternatively, positive pressure can be used instead of a vacuum to drive the filtration/washing process by simply placing a pressure hood having a supply of pressurized air or other gas over the top of the holder 2 (In this embodiment, the port 18 simply acts as an outlet for the pressurized air/gas.) The port 18 is located below the porous support 32. A waste collection device 22, in this instance, a receptacle, is mounted below the manifold or if desired in the manifold (not shown) to collect the liquid pulled through the device 2.

Alternatively, the waste collection device 22 can be a waste drain or other similar device as is known to one of ordinary skill in the art. In this instance the holder 2 is formed of a porous support structure 32, such as a plastic or metal grid or a porous sintered sheet of plastic or metal or other similar devices as are well known in the art. The one or more blotting membranes 34 is again placed on top of the support 32, over which is the flow distributor 36 and a well structure 38 (if desired) as described above in relation to the embodiments of Figure 2. Figure 8 shows the holder of Figure 2 mounted on a manifold described below in relation to Figure 4.

Figure 4 shows a preferred form of a manifold 40. The manifold has a base 42, having a drain and support surface 44 on which the holder 46 (formed of the lower support 48 and the upper flow distributor 50) is placed. As shown the holder uses a hinge 51 to hold the upper and lower portions to each other. One or more membranes are inserted between the lower and upper portions of the holder 46 which is then closed. Attached to the base 42 is a removable cover 52. In this embodiment the cover 52 is attached to the base 42 by pivot points 53 (one shown) so that it

can open and close upwardly and rotationally respective to the base 42. A separate well 54 may be mounted in an opening 55 in the cover 52. Preferably as shown, the bottom portion of the well 54 has an outwardly extending base or lip 56 that holds the well 54 in the opening 55. Additionally, the well 54 can be dimensioned such that there is a slight friction fit between it 54 and the opening 55 to also keep it in place. The cover 52 also has a device such as the clip 58 that mated with a detent 60 on the base 42 so that it can secure the lid 52 to the base 42 when the lid 54 is rotated into a closed position against the base 42. Also shown are the optional controls 62 for managing and monitoring the manifold 40 and the process. The device can be used with automated liquid handlers and the like if desired.

In an additional embodiment as shown in Figure 12, the manifold 90 can process more than one holder 94. The base 93 can be designed with multiple stations 92 to position multiple holders 94. Also as shown in this embodiment the holder 94 in each station 92 can be subdivided into two or more wells 98 if desired. The manifold 90 can have a common pressure source or each station 92 can be pressure controlled individually such as by control knobs 96 as shown. The cover 100 can close on all the holders or as in this embodiment can have a separate cover for each station 92. This format minimizes the laboratory bench space used for the higher through put laboratories.

The flow distributor 10 is a porous structure. The flow distributor not only provides even liquid distribution but it also acts as a flow regulator. It provides for complete and uniform distribution of the liquids as well as allowing sufficient time residence in the membrane for proper interaction between the molecules of the liquid and the specimen. In one embodiment, the entire structure is porous. In another embodiment, such as may be used in conjuncture with the embodiment of Figure 2, the flow distributor 10 is only porous in the area within the well(s) 12. The area 16 of the distributor 10 that is non-porous can be rendered so by filling the pores in that area 16 with a non-porous material such as a plastic or a glue, by collapsing the pores in that area 16 with heat and/or pressure and/or solvents as is well known in the art or by forming the distributor 10 to match the size of the outer dimension of the well(s) 12 and liquid tightly sealing the distributor 10 to the bottom of the well(s) 10 along its outer dimension (as shown in Figure 2).

The flow distributor 10 may be any porous structure that provides for even distribution of the liquid across its face and which is sufficiently porous to allow for easy movement under the

influence of a vacuum or pressure and which is also capable of filtering out agglomerates, particles and other debris from the liquid.

The flow distributor may be of any desired size. Gels come in a variety of "standard" sizes from about 7cm by 8cm to a 20cm by 20cm area. The flow distributor should preferably cover the entire blotting membrane to insure complete flow of reagents through all of the blotting membrane.

Such materials include but are not limited to woven, non-woven and fibrous porous filters such as TYVEK® or TYPAR® paper, cellulosic materials such as MF filters available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts, membranes such as DURAPORE® and MILLIPORE EXPRESS® microporous membranes available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts, sintered membranes such as POREX® filters and the like. Preferred are membranes, especially plastic microporous membranes.

A preferred pore size of such membranes is between about 0.1 and about 0.65 micrometer, preferably between 0.2 and about 0.45 micrometer and more preferably about 0.22 micrometer.

Additionally, the preferred porous structure has low binding characteristics for the reagents used in order to minimize the amount used. More preferably, as it is generally used with biological materials it is hydrophilic and has low protein binding characteristics. One such distributor is a hydrophilic DURAPORE® membrane formed of PVDF available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts. Another is a MILLIPORE EXPRESS® hydrophilic PES membrane available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts.

The porous support 4 may be a simple screen, a grid (as shown in Figures 1 and 2), a flow directing grid or a sintered porous structure such as a POREX® membrane or a coarse or large pored microporous filter, such as a woven or non-woven paper, a polypropylene or polyethylene fabric, a glass mat or paper, or a 1-10 micron microporous filter. Such supports can be made of polymer, glass, ceramic or metal materials including but not limited to metals, such as stainless steel or steel alloy, aluminum and the like, and polymers such as polyethylene, polypropylene, polysulfone, polyethersulfones, styrenes, nylons and the like.

Figure 10 shows a porous support in the form of a flow directing grid 70 consisting of a series of grooves 72 and openings 74. The openings 74 are inwardly positioned from the perimeter of the porous support 70. The openings 74 are in fluid communication with the grooves 72 so that fluid is collected in the grooves 72 and directed through the openings 74. The grooves 72 collect and deliver the spent fluid to the openings 74 which direct the fluid to a waste chamber

or the collection tray in the holder (manifold) (not shown). If the researcher wishes to collect one or more of the fluids, then a collection tray can be positioned inside the manifold below the openings 74 to collect the spent fluids. Figure 11 is an additional embodiment of the grid 80 for directing spent fluids into grooves 82 and out the openings 84. This embodiment consist of a series of rectangular grooves 82, it would be obvious to use other designs for grooves 72 or 82 and openings 74 or 84. The desired outcome is to direct the spent fluids to an opening or a series of openings that direct the spent fluids to a collection tray.

The outer edges of the support 4 and the flow distributor 10 may be made of the same materials as the support 4. When an integral hinge is used, it must be made of a flexible material such as polyethylene, polypropylene, an elastomer or one of the impact modified materials such as ABS, K-resin and the like. When a separate hinge, clips, elastic bands, adhesive film or other securing means are used they may be made of metal, plastic or elastomers as desired.

Figures 9A and 9B show another embodiment of the present invention in which the flow distributor 110 is in the form of a single (as shown) or preferably multiple well format 101. The support 112 is formed as a separate piece 111 that attaches to the wall(s) of the well(s) 114 of the distributor 110. This may be a friction fit or preferably a snap fit to releasably retain the structure together during use. Alternatively adhesives such as adhesive pads (not shown) can be mounted to the bottom side of the distributor 110 or the top surface of the piece 111 containing the support 112 to hold them together. A grid with a spout 116 is located at the bottom of the piece 111 that contains the support 112. A membrane 118 is laid on top of the support 112 which then attached to the flow distributor 110. The welled device 101 is then placed on or in a pressure or vacuum manifold 120 with a collection device such as a waste tray or a multiwell plate or a series of one or more tubes (as shown) to collect fluid that is moved through the system.

Various methods may be used in the present invention. The key factor being that they all rely on a vacuum or positive pressure driven filtration of the liquids to access the large inner surface area of the membrane allowing 3-D interaction of all the molecules throughout the depth rather than only 2-D interaction at the surface as has occurred in the past.

The simplest method is to use the present invention to conduct one or more of the washing cycles. Typically each washing cycle is comprised of one or more washing steps. Generally, 2-5 steps are used per cycle.

Another method is to use the present invention in each step in which liquid needs to be moved through the blotting membrane such as after incubation of the antibodies or in the washing steps.

In all of these processes, any pressure suitable to move the liquid(s) through the device and into the manifold can be used. This can vary depending upon the membranes selected for blotting and the flow distributor, the manifold used, the desired speed of the filtration and the supply of vacuum or positive pressure available to the researcher.

Generally, the vacuum available may vary between 100 and 760mm Hg (133 millibars and 1013 millibars). The use of valves, pressure restrictors and the like may also be used to keep the vacuum within the allowed ranges for the membranes used. A preferred vacuum manifold of one embodiment of the present invention uses of a vacuum of about 100 mm Hg. Other suitable vacuum manifolds include but are not limited to the MULTISCREEN™ and MULTISCREEN™_{HTS} vacuum manifolds available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts.

Generally the positive pressure is supplied by an air line at pressures ranging from about 2 psi to about 15 psi. The use of valves, pressure restrictors and the like may also be used to keep the pressure within the allowed ranges for the membranes used. Such pressure systems include but are not limited to Amicon® stirred cell devices available from Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts and positive pressure filtration units available from Caliper Life Sciences of Hopkinton, Massachusetts.

To use a device according to the invention one simply takes a holder, opens it and places the blotting membrane(s) on one of the surfaces such that the lower surface of the blotting membrane is adjacent the porous support and the upper surface of the blotting membrane is adjacent the flow distributor when the device is closed around the membrane(s) so as to have no air bubbles between the blot and the flow distributor. Bubbles between these two surfaces can cause areas of no flow. The device is placed on or in a manifold having a pressure supply (vacuum or positive pressure). Preferably the blotting membrane(s) has been prewet. The pressure (vacuum or positive pressure) is turned on and a liquid, such as a wash liquid or a reagent, is placed on top of the flow distributor or into the well(s) if used. The pressure continues until the liquid has been moved through the device and membrane(s). Then the pressure is turned off.

When more than one blotting membrane is used, they can be arranged in series on top of each other and sufficient liquid containing the same desired reagents can be easily moved through

the multiple layers in one process step. Generally when more than one layer is used it is preferred that one use between 2 and 10 layers, preferably between 2 and 5 layers at a time. Alternatively, one can use a flow distributor having multiple subwells and use more than one blotting membrane in parallel to each other, each with their own well in the flow distributor and each with its own set of reagents as is required for its specific purpose. Also one can mount two or more separate holders each with one or more subwells. One can even use multiple layers in adjacent wells if desired. With two or more separate holders, they may if desired be run independently of each other or together.

The liquid can either be added with the pressure supply being off or the supply being turned on only briefly so as to get the liquid into the membrane(s) and is allowed to incubate (such as may be required with the primary or secondary antibodies). The pressure is then turned on to remove the liquid and/or replace it with another used sequentially. Preferably, during washes, the vacuum is left on and remaining washes are added sequentially.

Optionally, if one wishes, one can place a collection vessel 70 below the device, preferably in the manifold itself or downstream. It can then be used to collect one or more unbound reagents that may be expensive and which can be collected and recycled for use in future assays. The vessel can also be subdivided into multiple chambers that are in alignment and fluid communication with the respective portion of the blotting membrane. One such collection vessel 70 is shown in Figure 7, with a central collection point 72 and support ribs 74 to mate with the downstream surface of the support 4. Other embodiments can also be used.

Additionally or alternatively, one can place in the downstream flow path below the holder an absorbent matrix that is capable of reversibly binding one or more unbound reagents that are expensive. The matrix is preferably in the form of a monolith, such as a pad, a plug or a paper sheet, that is positioned so that all the liquid passing through the blotting membrane and holder passes through the matrix. It can then either be removed and the reagent eluted or if desired, it can have the bound reagents eluted in situ after completion of the testing of the blotting membrane.

Other processes may also be used with the device of the present invention.

The membrane contains, in its interstices, one or more substances to be detected. Generally these substances are present in the interstices either by virtue of having been blotted from a solid support for electrophoresis or chromatography or by direct application, usually to detect the presence, absence, or amount of a particular type of material such as an antibody or specific protein – i.e. a Dot-Blot type assay as described above. The definition of the membrane is

not limited, however, to these instances, but applies to any case wherein a membrane contains in its interstices one or more substances to be detected. Included in the types of membranes envisioned for use in the present invention are membranes commonly used to blot electrophoresis gels such as nitrocellulose; nylon; or various other polymeric membranes, such as polyvinylidene fluoride (PVDF), sold as IMMOBILON™ membranes by Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts.

A variety of materials can be used to replicate the results of electrophoresis gels performed on various samples as is understood in the art. Most commonly, the samples contain biological substances such as individual proteins, antibodies, nucleic acids, oligonucleotides, complex carbohydrates, and the like, but the application of the technique is not limited to these substances. The invention technique is applicable to any membrane containing within it a substance to be detected regardless of the chemical composition of the membrane or of the target substances.

When membranes which represent replicas of electrophoretic results are employed, the transfer of the substances to be detected from the gel to the membrane can be conducted by utilizing membranes containing transfer buffer, by electroelution, or by dry blotting of the gels. Techniques for these transfers are well understood in the art, and do not constitute part of the invention herein.

The liquid to be supplied may contain detecting reagents or may simply be provided as a wash. The nature of the detecting reagent depends, of course, on the substance to be detected. Typically, proteins are detected by immunological reactions between antigen and antibody or immunoreactive portions thereof; typically the presence of nucleic acid fragments is detected by suitable oligonucleotide probes. The detecting substances responsible for the immediate or specific reaction with the substance to be detected may be further supplemented, if needed, with label and a multiplicity of applications of the detecting reagents may be needed- e.g., a protocol may include detection of an antigen by supplying an antibody labeled with an enzyme, e.g., commonly, horseradish peroxidase, and then this binding is detected by means of supplying substrate for this enzyme. In application of reagent, it is possible, though not preferred, to use only a positively pressed donor matrix to expose this component of the membrane for a defined period.

It is most convenient to conduct the method of the invention at room temperature, but elevated and lower temperatures can also be used. This can be effected by heating the device, its surrounding environment (as in a heat box or cooling box) or the liquids used in the system.

Blots can be sequentially analyzed with multiple antibodies or probes in the present device and process by stripping the previously bound antibodies from the blot followed by subsequent incubations with antibodies or other probes specific other target proteins. The stripping process disrupts the antigen-antibody bonds and dissolves the antibodies in the surrounding buffer. This is usually achieved by a combination of detergent and heat or by exposure to either high or low pH. The device, in combination with the flow distributor, enables the stripping of blots using the high or low pH method. The subsequent reprobing of blots either directly (*e.g.*, using the same flow distributor used for stripping) or subsequently after storage, would use the same protocol as the initial probing. Suitable kits for strip blotting are available from Chemicon International, Inc under the brand names of ReBlot™ Plus kit (catalogue # 2500), ReBlot Plus-Mild solution (catalogue # 2502) and ReBlot Plus-Strong solution (catalogue #2504).

In standard western blotting, the antigen or target is transferred to a membrane support and probed with a suitable probe such as an antibody, protein (*e.g.*, Protein A) or lectin (proteins or glycoproteins which binding to carbohydrate moieties). In some applications, a reverse format (*e.g.*, reverse array) is used, wherein the antibody or other probes are spotted onto a membrane or other support (typically in an array format) and the antigen or target is presented to the immobilized antibodies on the array. Visualization of a target-probe binding event can be achieved by labeling of the antigens or targets or by using a secondary antibody specific for the target. Reverse arrays often employ mixtures of targets, for example lysates labeled with different fluorescent colors to enable parallel processing. Reverse assays can also be performed with the present invention.

Brief Description of Drawings

Figure 1 shows a first embodiment of a device according to the present invention in perspective view.

Figure 2 shows a second embodiment of a device according to the present invention in perspective view.

Figure 3 shows a device according to the present invention mounted in a manifold in cross-sectional view.

Figure 4 shows an embodiment of the device in a manifold according to the present invention in perspective view.

Figure 5 shows a third embodiment of a device according to the present invention in perspective view.

Figure 6 shows a fourth embodiment of a device according to the present invention in perspective view.

Figure 7 shows an embodiment of a reagent collection device according to the present invention in perspective view.

Figure 8 shows a preferred embodiment of a device in a manifold according to the present invention in perspective view.

Figures 9A and B show another embodiment of the device of the present invention.

Figure 10 shows an embodiment of the porous support in perspective view.

Figure 11 shows an alternative embodiment of the porous support in perspective view.

Figure 12 shows an embodiment of the present invention in perspective view.

Claims

1. A device for conducting immunoassays comprising a holder formed of a porous support and a flow distributor wherein the holder has a means for releasably securing the support and distributor to each other.
2. The device of claim 1 wherein the means for releasably securing the support and distributor to each other is in the form selected from the group consisting of hinges, clips, elastic bands, adhesives, ball and socket, pins and recesses, or cooperatively engaging fasteners.
3. The device of claim 1 wherein the means for releasably securing the support and distributor to each other is in the form of a hinge.
4. The device of claim 1 wherein the flow distributor has a lower and an upper surface and the upper surface has one or more wells mounted on the upper surface of the flow distributor.
5. The device of claim 1 wherein the flow distributor has a lower and upper surface and the upper surface has one or more wells mounted on the upper surface of the flow distributor wherein the well(s) is a separately formed part.
6. The device of claim 1 wherein the flow distributor has a lower and upper surface and the upper surface has one or more wells mounted on the upper surface of the flow distributor wherein the well(s) is an integrally formed portion of the upper surface of the flow distributor.
7. The device of claim 1 wherein the holder is made of a material selected from the group consisting of plastic, paper, metal, ceramic and combinations thereof.

8. The device of claim 1 further comprising a collection tray below the holder for the recovery of reagents.

9. The device of claim 1 further comprising a collection tray below the holder for the recovery of reagents and wherein the tray is subdivided into two or more separate subtrays.

10. A device for conducting vacuum assisted immunoassays comprising a vacuum manifold and a holder formed of a porous support and a flow distributor wherein the holder has a means for releasably securing the support and distributor to each other.

11. A device for conducting vacuum assisted immunoassays comprising a vacuum manifold and one or more holders formed of a porous support and a flow distributor wherein the holder has a means for releasably securing the support and distributor to each other, one or more membranes containing one or more biological entities to be assayed, the one or more membranes being mounted on top of the porous support and the flow distributor being on top of the one or more membranes.

12. A device for conducting pressure assisted immunoassays comprising a collection manifold, one or more holders formed of a porous support and a flow distributor wherein the one or more holders has a means for releasably securing the support and distributor to each other, one or more membranes containing one or more biological entities to be assayed, the one or more membranes being located on top of the porous support, the flow distributor being on top of the one or more membranes, one or more reagent wells mounted on top of the flow distributor, a pressure cap removably sealed on top of the one or more reagent wells, the cap having an inlet to its interior, the inlet being connected to a source of positive gas pressure.

13. The device of claim 1 wherein the flow distributor is a membrane.

14. The device of claim 10 further comprising a collection tray below the holder for the recovery of reagents.

15. The device of claim 10 further comprising a collection tray below the holder for the recovery of reagents and wherein the tray is subdivided into two or more separate subtrays.

16. The device of claim 10 further comprising an absorbent matrix downstream of the holder for binding and eluting reagents.

17. The device of claim 10 further comprising an absorbent matrix downstream of the holder for binding and eluting reagents and wherein the matrix is in the form of monolith.

18. The device of claim 1 wherein the flow distributor has a lower and an upper surface and the upper surface has a well mounted on the upper surface of the flow distributor.

19. The device of claim 1 wherein the holder has more than one flow distributor and each flow distributor has a lower and an upper surface and has one well mounted on the upper surface of each of the one or more flow distributors.

20. The device of claim 10 further comprising a collection tray below the holder for the recovery of reagents and a porous support having one or more grooves and openings wherein said openings are positioned inwardly from the perimeter of said collection tray.

21. The device of claim 11 wherein there are two holders which are run independently of each other.

22. The device of claim 11 wherein there are two holders which are run simultaneously with each other.

23. The device of claim 12 wherein there are two holders which are run independently of each other.

24. The device of claim 12 wherein there are two holders which are run simultaneously with each other.

1. Abstract

The invention is directed to an apparatus useful in conducting detection of compounds on blotting membranes. The device is comprised of several layers including a porous support layer below the blotting membrane(s), a flow distributor above the blotting membrane(s) and optionally a well on the flow distributor to contain the liquid to the desired area and to allow for lower starting volumes of such liquid. Preferably, the flow distributor is a non-binding or low binding hydrophilic porous membrane such as a 0.22 micron membrane and the support layer is a grid or sintered porous material. The distributor and support are held together to form an envelope around the membrane(s). The use of a hinge, clips and other such devices is preferred in doing so.

2. Representative Drawing

Fig. 1

Fig. 1

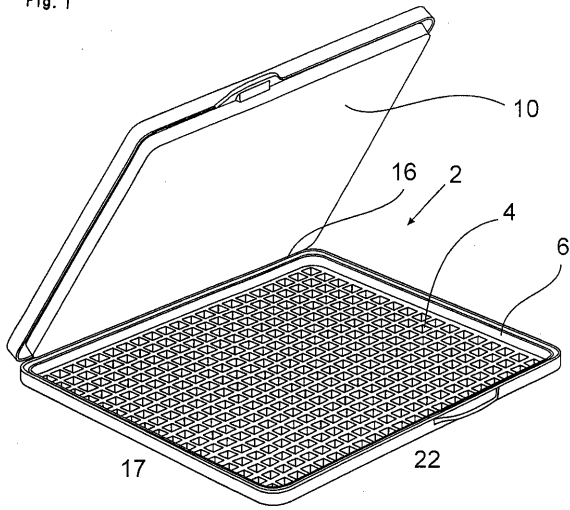


Figure 1

Fig. 2

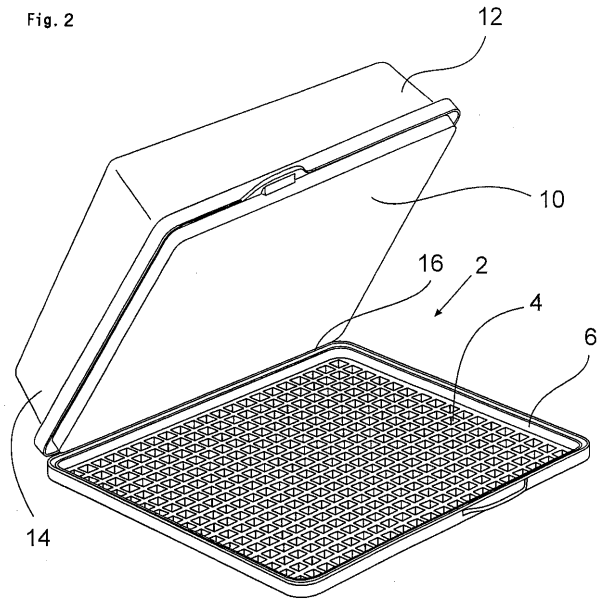


Figure 2

Fig. 3

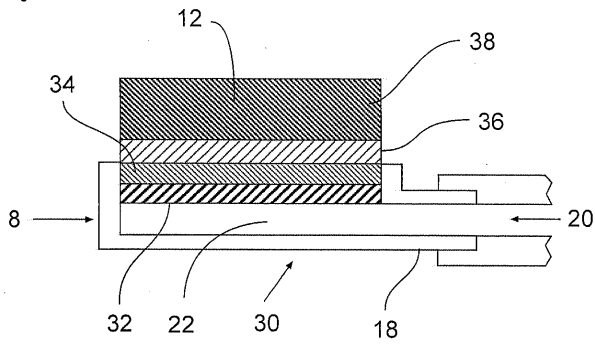


Figure 3

Fig. 4

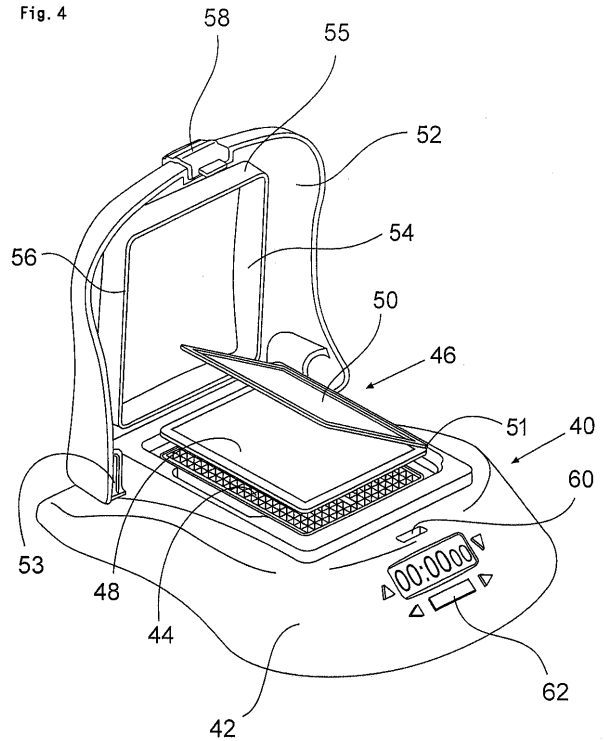


Figure 4

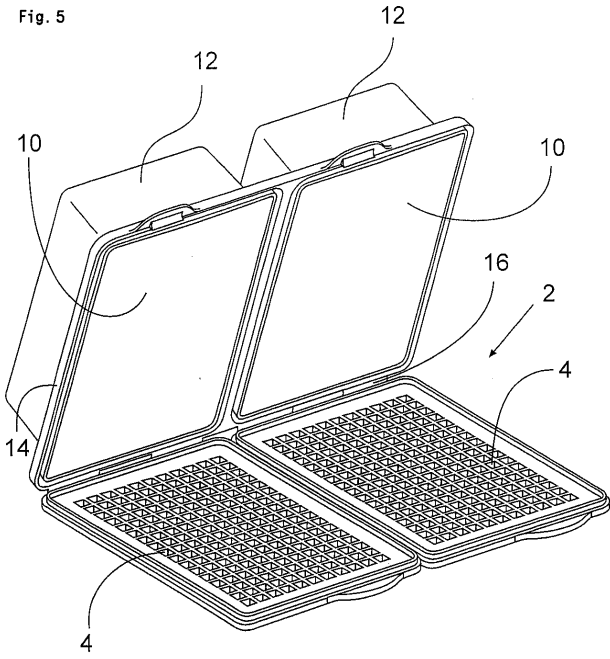


Figure 5

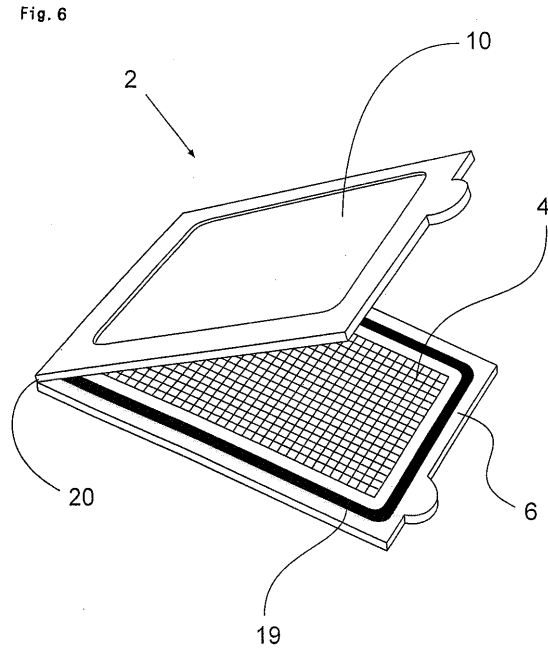


Figure 6

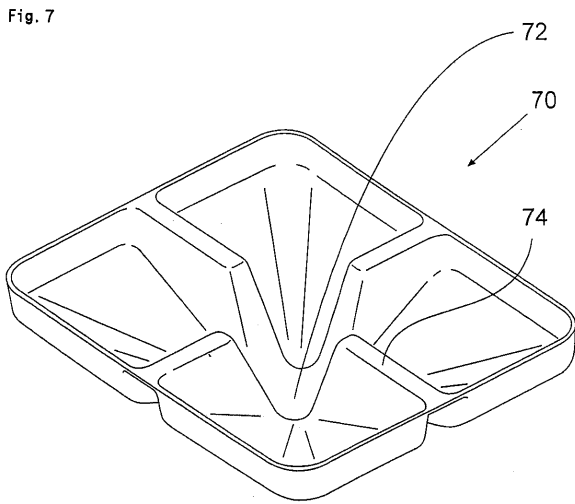


Figure 7

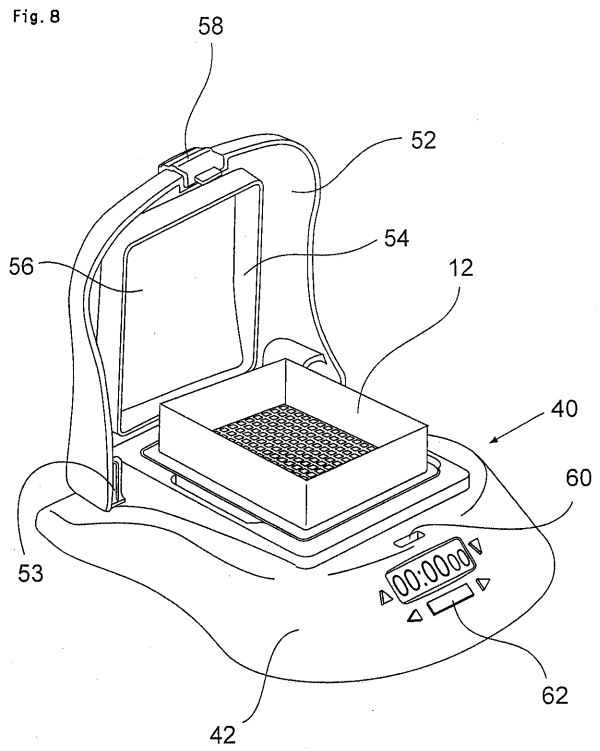


Figure 8

Fig. 9 A

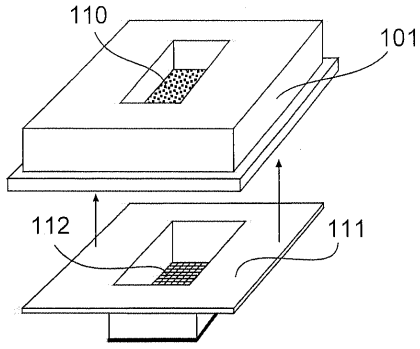


Figure 9A

Fig. 9 B

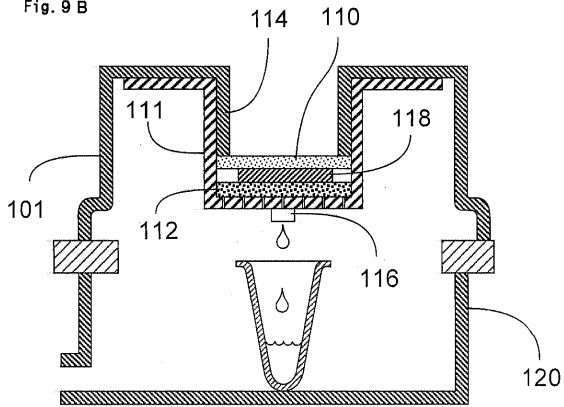


Figure 9B

Fig. 10

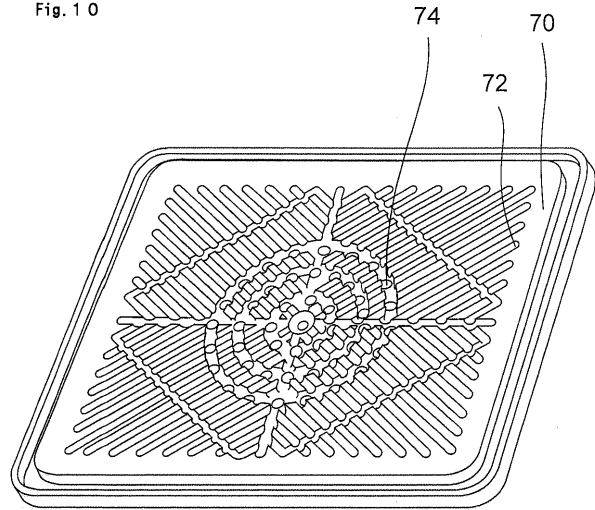


Figure 10

Fig. 11

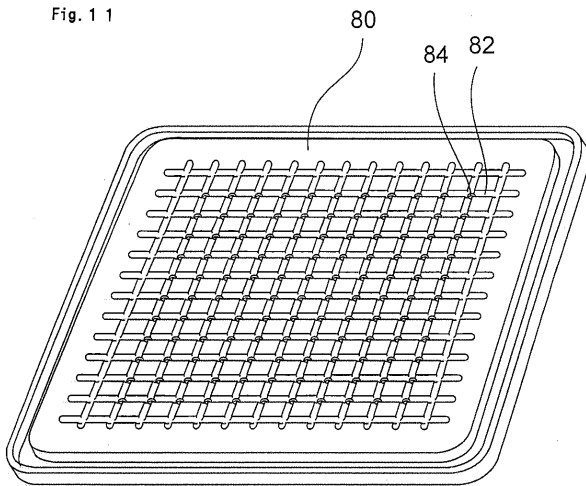


Figure 11

Fig. 12

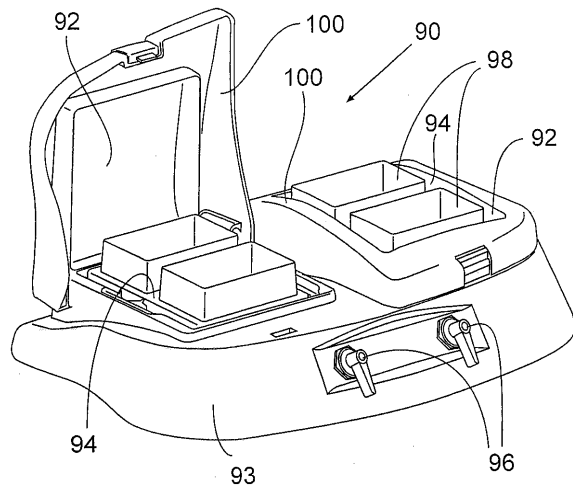


Figure 12

专利名称(译)	免疫测定的产品和工艺		
公开(公告)号	JP2007163465A	公开(公告)日	2007-06-28
申请号	JP2006292152	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		
[标]发明人	馬淵昌治 木村浩子 マークエメリック 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・エメリック フィリップ・クラーク クルト・グリーニゼン		
IPC分类号	G01N33/53 B01D57/02 B03C5/00 G01N33/543		
CPC分类号	B01L3/5025 B01L3/50255 B01L3/50853 B01L2200/0642 B01L2300/043 B01L2300/069 B01L2300/0829 B01L2400/0487		
FI分类号	G01N33/53.D B01D57/02 B03C5/00.Z G01N33/543.597 G01N33/53.T		
F-TERM分类号	4D054/FB20		
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 60/795532 2006-04-27 US		
其他公开文献	JP4388945B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供检测印迹膜中所含物质并定位的装置和方法。解决方案：本发明涉及一种在检测印迹膜上的化合物方面有前途的装置。该装置包括若干层，在一个或多个吸墨膜下面容纳多孔载体；在一个或多个吸墨膜上方的流量分配器，以及在流量分配器上任意一个孔，以将液体容纳到所需区域并允许液体的较低起始体积。优选地，分流器是非结合或低结合亲水性多孔膜，例如0.22微米膜。支撑层是网格或烧结多孔材料。流量分配器和支撑件保持在一起以形成围绕一个或多个膜的封套。优选地以这种方式使用铰链，夹子和其他这样的装置。 Z

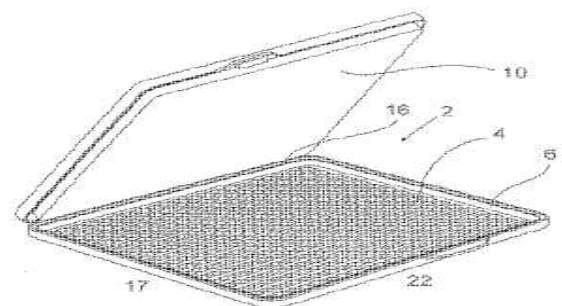


Figure 1

