



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105466879 B

(45)授权公告日 2019.05.17

(21)申请号 201510811246.1

(22)申请日 2012.04.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105466879 A

(43)申请公布日 2016.04.06

(30)优先权数据

61/475,434 2011.04.14 US

(62)分案原申请数据

201210110466.8 2012.04.13

(73)专利权人 EMD密理博公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 E·切尔诺卡尔斯卡亚 V·乔西

P·克拉克 C·乌特札特

R·阿玛拉 T·S·里德尔

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 安琪 张晓威

(51)Int.Cl.

G01N 21/3563(2014.01)

G01N 21/3577(2014.01)

G01N 21/359(2014.01)

(56)对比文件

US 5764355 A, 1998.06.09,

US 5605838 A, 1997.02.25,

CN 101883865 A, 2010.11.10,

US 5958345 A, 1999.09.28,

JP 特开2010-8209 A, 2010.01.14,

Emanuel Carrilho等.Paper Microzone

Plates.《Analytical Chemistry》.2009,

审查员 樊凯利

权利要求书2页 说明书14页 附图15页

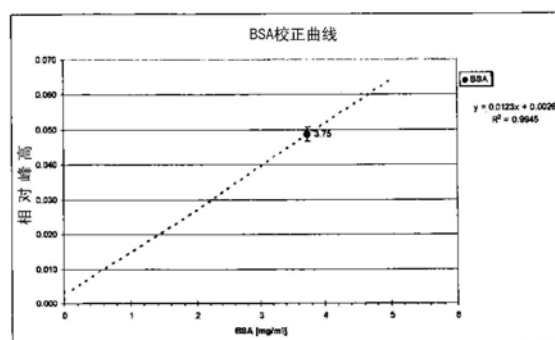
(54)发明名称

基于红外线(IR)定量生物分子的装置和方法

法

(57)摘要

本发明涉及基于红外线(IR)定量生物分子的装置和方法。具体而言,本发明提供使用基于IR的技术定量样品中的一种或多种生物分子的方法、用于这样的方法中的样品架装置以及制造这样的样品架装置的方法。



1. 用于定量样品中的一种或多种生物分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供包含多孔膜的样品架,所述多孔膜包含被疏水区包围的用于容纳样品的亲水区;

(b) 使所述膜的所述亲水区与样品体积接触,其中所述亲水区具有直径;

(c) 干燥所述膜上的所述样品体积;

(d) 将所述膜上的所述样品体积暴露于红外光束,由此获得红外吸收光谱,其中所述红外光束具有等于或大于所述亲水区的直径的直径,并且包含 $4000-400\text{cm}^{-1}$ 光谱范围内或 $4000-400\text{cm}^{-1}$ 光谱范围的任意部分内的波长;

其中所述红外吸收光谱中的一个或多个吸收峰面积与所述样品中的所述一种或多种生物分子的量相关。

2. 权利要求1的方法,其中所述一种或多种生物分子选自核酸、蛋白质、脂质和多糖。

3. 权利要求1的方法,其中所述一种或多种生物分子选自脂多糖。

4. 权利要求3的方法,其中所述脂多糖是内毒素。

5. 权利要求1的方法,其中所述方法不需要使用者在每次分析样品以定量所述一种或多种生物分子时生成校正曲线。

6. 权利要求1的方法,其中样品体积为 $0.1-20\mu\text{l}$ 。

7. 权利要求6的方法,其中样品体积为 $1\mu\text{l}$ 或更小。

8. 权利要求1的方法,其中所述样品架是卡式样品架。

9. 权利要求8的方法,其中所述卡式样品架包含多孔膜,所述多孔膜包含其中将所述样品容纳于所述膜上的区域。

10. 权利要求9的方法,其中所述膜上用于容纳样品的所述区域包含被疏水区包围的亲水区。

11. 权利要求10的方法,其中所述疏水区是通过等离子体处理亲水性多孔膜而形成的。

12. 权利要求10的方法,其中所述样品被容纳于所述亲水区内。

13. 权利要求10的方法,其中所述疏水区是通过热处理亲水性多孔膜而形成的。

14. 权利要求1的方法,其中所述样品包括生物液体。

15. 权利要求14的方法,其中所述生物液体选自血液、血浆、血清和尿液。

16. 权利要求1的方法,其中所述样品包括细胞裂解产物或组织裂解产物。

17. 权利要求1的方法,其中所述样品是粗样品。

18. 权利要求1的方法,其中所述多孔膜是超滤膜。

19. 权利要求1的方法,其中所述多孔膜是微孔膜。

20. 权利要求1的方法,其中所述多孔膜包含选自PVDF(聚偏氟乙烯)、聚四氟乙烯、聚乙烯和聚丙烯的高分子材料。

21. 权利要求1的方法,其中所述多孔膜包含选自亲水性聚四氟乙烯的高分子材料。

22. 用于权利要求1的方法中的卡式样品架,其中所述卡式样品架包含多孔膜,所述多孔膜包含被疏水区包围的亲水区,其中所述样品被容纳于所述亲水区的边界内。

23. 权利要求22的卡式样品架,其中所述亲水区的直径是 $2.0\text{mm}-10\text{mm}$ 。

24. 权利要求22的卡式样品架,其中所述亲水区的直径是 $3.0\text{mm}-6\text{mm}$ 。

25. 用于定量样品中的一种或多种生物分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供包含多孔膜的卡式样品架,所述多孔膜包含被疏水区包围的用于容纳样品的亲水区;

(b) 使所述膜的所述亲水区与样品体积接触;

(c) 干燥所述膜上的所述样品体积;

(d) 使用红外吸收检测所述膜上是否存在水分并在必要时重复步骤(c)直到不能检出水分;以及

(e) 将所述膜上的所述样品体积暴露于包含 $4000-400\text{cm}^{-1}$ 光谱范围内或所述光谱范围的任意部分内的波长的红外光束,由此获得红外吸收光谱;

其中所述红外吸收光谱中的一个或多个吸收峰面积与所述样品中的所述一种或多种生物分子的量相关。

基于红外线 (IR) 定量生物分子的装置和方法

[0001] 本申请是2012年4月13日提交的发明名称为“基于红外线 (IR) 定量生物分子的装置和方法”的中国专利申请201210110466.8的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年4月14日提交的美国临时专利申请第61/475,434 号的优先权, 该申请的全部内容以其整体援引加入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及用于定量样品中的分析物的红外分光光度法领域和用于所述方法中的装置。

背景技术

[0005] 红外 (IR) 光谱法是研究实验室中用于分析样品的常用分析工具。电磁波谱的IR区从可见光区的低端(波数约 $14,300\text{cm}^{-1}$) 延伸至微波区(接近 20 cm^{-1})。通常,对于吸收IR的分子而言,该分子内的振动或转动必须引起该分子偶极矩的净变化。辐射的交替变化的电场与该分子的偶极矩的波动相互作用,并且如果辐射的频率与该分子的振动频率相匹配时,则所述辐射被吸收,由此引起分子振动幅度的变化。

[0006] 通常,对于生物分子例如蛋白质的定量分析,最常用的技术是比色法(例如考马斯蓝测定法、Lowry测定法、BCA测定法以及Pierce 660蛋白质测定法)和UV光谱技术(例如在280nm处的吸收)。在本领域已知的大多数定量方法中,在使用者每次进行定量时,使用者需要使用校正物(calibrant)生成校正曲线,所述校正物通常是与被定量的分析物相同的分子。

发明内容

[0007] 本发明提供用于定量样品中的分析物特别是生物分子的改进的方法,其比本领域中已知的大多数方法需要更短的操作时间和更小的样品体积,并且不需要如本领域已知的大多数方法所需的任何特殊的样品准备步骤。另外,本发明的方法还避免了使用者在每次定量分析物时生成校正曲线的需要,并且也不需要所述校正物是与被定量的分析物相同的分子。本发明还提供用于所要求保护的方法中的装置。

[0008] 一方面,本发明提供用于定量样品中的一种或多种生物分子的基于IR 的方法。

[0009] 在一种本发明的用于定量样品中的一种或多种生物分子的方法中,所述方法包括以下步骤:(a) 提供包含多孔膜的样品架,所述多孔膜包含被疏水区包围的用于容纳样品的亲水区;(b) 使所述膜的所述亲水区与样品体积接触;(c) 干燥所述膜上的所述样品体积;(d) 将所述膜上的所述样品体积暴露于包含 $4000\text{--}400\text{cm}^{-1}$ 光谱范围内或所述光谱范围的任意部分内的波长的红外光束,由此获得红外吸收光谱;其中所述红外吸收光谱中的一个或多个吸收峰面积与所述样品中的所述一种或多种生物分子的量相关。

[0010] 在另一本发明的用于定量样品中的一种或多种生物分子的方法中,所述方法包括

以下步骤：(a) 提供包含多孔膜的样品架，所述多孔膜包含被疏水区包围的用于容纳样品的亲水区；(b) 使所述膜的所述亲水区与样品体积接触；(c) 干燥所述膜上的所述样品体积；(d) 通过红外吸收检测步骤(c)后的所述样品体积中是否存在水分，并在必要时重复步骤(c)直到不能检出水分的存在；以及(e)将所述膜上的所述干燥的样品体积暴露于包含 $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ 光谱范围内或所述光谱范围的任意部分内的波长的红外光束，由此获得红外吸收光谱；其中所述红外吸收光谱中的一个或多个吸收峰面积与所述样品中的所述一种或多种生物分子的量相关。

[0011] 在所要求保护的方法的一些实施方案中，所述一种或多种生物分子选自核酸、蛋白质、脂质、多糖和脂多糖。示例性的脂多糖是内毒素。

[0012] 在各种实施方案中，所述光谱中的一个或多个吸收峰面积各自与所述样品中的特定生物分子的量相关。

[0013] 在一些实施方案中，本发明的方法不需要在每次定量分析物时生成校正曲线。

[0014] 在本发明的一些实施方案中，将一条或多条校正曲线预载入所使用的仪器中，由此避免使用者每次想要定量样品中的分析物时生成校正曲线的需要。在定量蛋白质和肽的情况下，所述定量是基于存在于多肽分子中的酰胺键的数量或酰胺键的浓度，因此所述定量与该分子的氨基酸序列无关。因此，与在每次定量分析物(例如蛋白质或肽)时需要生成校正曲线并且还需要所述校正物是与被定量的分析物相同的分子的本领域已知并使用的大多数方法不同，在本发明的方法中，可将任意蛋白质用作校正物来生成之后被预载入所使用的仪器中的校正曲线。

[0015] 相似地，在定量其它分析物例如核酸、碳水化合物等的情况下，可使用任意适合的校正物来生成被预载入所使用的仪器中的校正曲线。本发明的方法可用于定量具有非常小的样品体积的分析物。在所要求保护的方法的各种实施方案中，所述样品体积为 $0.1\text{--}20\mu\text{l}$ 。在一具体实施方案中，所述样品体积为约 $2\text{--}5\mu\text{l}$ 或更小，或小于 $1\mu\text{l}$ 。

[0016] 在一些实施方案中，所述样品包括生物液体，例如血液、血浆、血清和尿液。在其它实施方案中，所述样品是环境样品、药物样品或食物样品。在其它实施方案中，所述样品是燃料样品。

[0017] 在一些实施方案中，所述样品包括细胞裂解产物或组织裂解产物。

[0018] 在各种实施方案中，所述样品是粗样品。

[0019] 在一些实施方案中，所述多孔膜是超滤膜。在其它实施方案中，所述多孔膜是微孔膜。

[0020] 在本发明的方法的一些实施方案中，所述多孔膜包含选自PVDF(聚偏氟乙烯)、PTFE(聚四氟乙烯)、亲水性PTFE和聚乙烯的高分子材料。在一具体实施方案中，多孔膜包含亲水性PTFE。然而，任意适合的高分子材料可用于本发明的方法中。高分子材料/膜的选择会在很大程度上取决于被定量的分析物。例如，使用与所关注的分析物在相同的波长处具有吸收和/或干扰吸光度测定的高分子材料是不期望的。

[0021] 在一些实施方案中，样品被点样于其上的多孔膜被包含于为方便起见被称作样品架的装置内。在一具体实施方案中，所述样品架是卡片形式，并且为方便起见被称作卡式样品架(sample holder card)。

[0022] 在所要求保护的方法的各种实施方案中，所述样品架包含多孔膜，所述多孔膜包

含其中将所述样品体积容纳于所述膜上的区域。在一些实施方案中,用于容纳样品的所述区域包含疏水区内的亲水区,其中所述样品体积被容纳于所述亲水区内。

[0023] 在一些实施方案中,所述疏水区是通过用等离子体处理亲水性多孔膜而形成的。在其它实施方案中,所述疏水区是通过热处理亲水性多孔膜而形成的。

[0024] 在一些实施方案中,所述亲水区包含一个或多个疏水区点或者一条或多条疏水区线。

[0025] 重要的是将所述样品体积容纳于所述亲水区的直径内。所述亲水区的直径取决于所使用的IR仪器的光束直径,其中所述光束穿过被容纳于所述亲水区内的样品。为了有助于准确地定量,需要使亲水区的直径小于或等于IR光束的直径。这确保IR光束可照射到整个样品体积并且确保实现准确的定量。

[0026] 在一些实施方案中,所述样品架的亲水区的直径为2.0mm-9.2mm。在一些实施方案中,所述亲水区的直径为3.0mm-6mm。在一些实施方案中,被点样到膜上的样品体积包含表面活性剂。在一些实施方案中,在将样品点样到膜上之前或之后将表面活性剂点样到所述膜上。

附图说明

[0027] 图1是为将来的使用生成的示例性校正曲线。在某一天用BSA生成校正曲线(虚线)。在数天后(例如此处为4天后)准备4mg/ml的BSA样品,并根据之前生成的校正曲线进行检验。

[0028] 图2是本发明的示例性样品架的示意图。该示例性样品架是包含四个不同的用于施加样品溶液体积的膜点样孔(spot)的卡片,各点样孔包含被疏水区包围的亲水区。被称作样品点样孔1、2和3的点样孔用于点样在适合的缓冲液中含有所关注的生物分子的样品体积,而点样孔B是用于点样空白溶液或单独的缓冲液的体积。点样于点样孔1、2和/或3的样品体积可代表相同的样品溶液或由不同的样品溶液构成。

[0029] 图3是显示定量同一样品中的蛋白质和核酸的代表性实验结果的红外吸收光谱。该实验中使用的蛋白质是BSA。X-轴表示以 cm^{-1} 为单位的波数,并且Y-轴表示吸光度单位。该图证明使用本发明的基于IR的方法能够定量同一样品中的DNA和蛋白质(即BSA)二者。

[0030] 图4是显示定量样品中的肽的代表性实验结果的红外吸收光谱。BSA 被用作该定量实验中的蛋白质标准品。X-轴表示以 cm^{-1} 为单位的波数,并且Y-轴表示吸光度单位。

[0031] 图5是显示定量水中的脂多糖(LPS,其为内毒素)的实验结果的红外吸收光谱。X-轴表示以 cm^{-1} 为单位的波数,并且Y-轴表示吸光度单位。该光谱表明,当水中的LPS浓度从20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 降低至0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时光谱强度降低。而且,利用该试验生成使用LPS的校正曲线,并且该校正曲线用于之后的内毒素定量。

[0032] 图6是显示监测/测定/检测样品中是否存在水分的实验结果的红外吸收光谱。X-轴表示以 cm^{-1} 为单位的波数,并且Y-轴表示吸光度单位。如该图谱所示,当样品中存在水分时,存在与水的-OH键相关的键伸缩和弯曲振动引起的光谱干扰,其干扰蛋白质酰胺键的分辨率。但是,当将样品干燥并且使水分蒸发时,与水相关的光谱强度降低,这也显示于该图谱中。

[0033] 图7显示了证明当向样品中加入表面活性剂(例如SDS)时样品具有更均匀的分布

和吸收特征的图。X-轴表示以 cm^{-1} 为单位的波数,并且Y-轴表示吸光度单位。

[0034] 图8A和8B分别显示了用于等离子体基样品容纳中的固定装置和卡式样品架组件的敞开视图和闭合视图。图8A显示完全组装好的卡式样品架和固定装置两侧的敞开构造。图8B显示在真空等离子体环境内的卡式样品架和固定装置组件的闭合横截面示意图,其中将卡式样品架上期望为疏水性的膜区域暴露于等离子体处理,而保护样品被点样于其上的亲水区以免被等离子体处理。

[0035] 图9显示了等离子体处理后的卡式样品架的示意图。亲水区表示被保护的膜区域,其被暴露于等离子体处理的疏水区包围。

[0036] 图10A-10D显示了卡式样品架的膜内的疏水区和亲水区的示例性形状/图形,可通过适当地放置弹性密封圈(seal)(在等离子体处理法的情况下)或通过成型热板(heated plate)(在加热处理法的情况下)形成所述形状/图形。

[0037] 图11是用于在所述膜内生成疏水样品容纳区的凸起固定装置和卡式样品架系统的展开图,包括热板和硅酮基质。

[0038] 图12A和12B分别显示将所述卡式样品架置于所述系统中后,凸起头(embossing head)/热板系统的敞开和闭合横截面图。

[0039] 图13A-13D显示表明相对于未进行热处理的膜(如图13A(第0秒)和图13B(第30秒)所示),膜在热处理后将样品(例如水)保留于所述样品容纳区内(如图13C(第0秒)和图13D(第30秒)所示)的实验的结果。

[0040] 图14A和14B分别显示化学破坏和物理破坏对样品的“咖啡环”沉积模式的作用。图14A显示当向样品中加入去污剂(SDS)时通过化学破坏使样品分布的均匀性增加。将溶解于水和磷酸盐缓冲盐水(PBS)二者中的细胞色素C(10mg/ml)置于亲水性PTFE膜($2\mu\text{L}$ 和 $5\mu\text{L}$)上并将其干燥。向所述样品中加入SDS导致更均匀的样品分布(PBS+SDS未显示)。图14B显示引起多个“咖啡环”并且使更多的样品位于所述样品区的中心的对样品分布的物理破坏(通过改变疏水屏障)。

[0041] 图15是显示向样品中加入SDS的作用的柱状图。将SDS(1%和5%)加入到细胞色素C样品中并干燥。加入SDS导致各自的峰面积增加。

[0042] 图16是显示IR光谱的峰高和峰面积的示意图。

具体实施方式

[0043] 本发明提供使用红外光谱法(IR)定量样品中的一种或多种生物分子的改进的方法以及用于本发明的方法中的装置。

[0044] 为了更容易地理解本发明,首先对某些术语进行定义。对另外的定义的阐述贯穿于详细的说明中。

[0045] I. 定义

[0046] 在本文中互换使用的术语“定量”或“测定”指使用本发明的方法测定样品中分析物的量或浓度。本文使用的术语“分析物”指期望使用本文所述的方法进行定量的任意所关注的分子。在各种实施方案中,分析物是生物分子。

[0047] 本文使用的术语“生物分子”指期望使用本发明的方法进行定量的任意所关注的生物材料。示例性的生物分子包括蛋白质、肽、包括DNA和RNA在内的核酸分子、脂质、碳水

化合物和内毒素(例如脂多糖)。可使用本发明的方法定量任意生物分子,只要该生物分子在电磁波谱的红外范围内能够吸收。

[0048] 本文使用的术语“样品”指包含欲使用本发明的方法定量的分析物(例如生物分子)的任意介质。样品可包括但不限于例如食物(例如家禽、新鲜的肉类、奶、酸奶、乳制品、烘烤产品、饮料、啤酒、柠檬水、果汁、奶酪、蔬菜、水果、鱼等)、水体或污水体(例如池塘水、湖水、河水、海水、下水道污水、饮用自来水等)、临床样本(例如血液、血浆、血清、痰、组织、尿液、唾液、来自呼吸道的样品/液体等)、土壤以及化妆品和药品(例如洗剂、乳膏剂、软膏剂、溶液剂、药品、滴眼剂和滴耳剂等)。在一具体实施方案中,样品包括细胞裂解产物或组织裂解产物。在本发明的各种实施方案中,样品可以是粗样品,即其在用于要求保护的方法中之前无需任何准备或处理。

[0049] 在一些实施方案中,将小体积(例如0.1–20 μ l)的样品吸移或点样到包含于样品架(例如为卡片形式)内的膜的亲水区,随后进行干燥,之后将所述样品暴露于基于IR的光谱法。可使用任意适合的方法干燥所述卡片上的样品体积。例如,可将所述样品体积风干或者使用对流加热器或常规的烘箱或者甚至是微波炉干燥。在一些实施方案中,将干燥装置并入所述IR系统中。一般而言,由于水分可能妨碍获得准确的定量,因此期望在定量前样品体积中不存在痕量的水分。

[0050] 在要求保护的方法的一些实施方案中,对样品体积被点样到其上的膜进行干燥步骤,然后利用红外吸收检测是否存在水分。如果检测到水分,则再次对所述膜进行干燥步骤并且重复所述干燥步骤直到不能检测出水分的存在。通常,在干燥步骤后吸光度无进一步变化表示不能检测出水分的存在,或者换言之,对于IR分析而言,所述样品是足够干燥的。

[0051] 本发明的方法和装置使得能够使用非常小的样品体积实现对样品中分析物的准确定量。在各种实施方案中,所述样品体积是约0.05 μ l、0.1 μ l 或0.2 μ l或0.3 μ l或0.4 μ l或0.5 μ l或0.6 μ l或0.7 μ l或0.8 μ l或0.9 μ l或 1.0 μ l或1.5 μ l或2 μ l或2.5 μ l或3 μ l或3.5 μ l或4 μ l或4.5 μ l或5 μ l或5.5 μ l或6 μ l或6.5 μ l或7 μ l或7.5 μ l或8 μ l或8.5 μ l或9 μ l或9.5 μ l或10 μ l 或10.5 μ l或11 μ l或11.5 μ l或12 μ l或12.5 μ l或13 μ l或13.5 μ l或14 μ l 或14.5 μ l或15 μ l或15.5 μ l或16 μ l或16.5 μ l或17 μ l或17.5 μ l或18 μ l 或18.5 μ l或19 μ l或19.5 μ l或20 μ l或大于20 μ l。尽管本文所述的装置和方法有助于使用非常小的体积来定量一种或多种生物分子,但是为了提高使用本文所述方法的检测下限和定量下限,可将多个等分部分的样品体积施加到卡式样品架上,并在该等分部分之间干燥所述样品体积。举例而言,在样品含有非常低水平的分析物(其可能难以或不能通过使用本文所述方法检测出)的情况下,可将多个等分部分的某样品体积(例如10–20 μ l)点样到卡式样品架上,并在不同的等分部分之间干燥所述样品体积。因此,尽管每次施加仅将10–20 μ l的小体积点样到所述卡式样品架上,但是在所述样品体积的多次施加中能够总共施加50 μ l–100 μ l或更多的总样品体积,并在多次施加之间干燥各样品体积。

[0052] 在一些实施方案中,通过将20 μ l的样品体积施加到卡片上并干燥所述卡片来将100 μ l或更大的样品体积施加到所述卡式样品架上。一旦所述样品体积完全干燥,则可将另外的20 μ l样品体积施加到所述卡式样品架上,并且可再次干燥所述卡片。可将该过程重复多次以将需要的样品体积点样到所述卡片上。该技术的优点在于其提高了分析物检测/定量的下限。

[0053] 本文使用的术语“裂解”指可将细胞或组织破开的任意方式,例如通过破坏细胞膜并可能引起细胞的内容物释放。可用于裂解细胞或组织的示例性方法包括但不限于酶法、超声、机械作用(例如剪切和挤压)和化学方法。

[0054] 本文使用的术语“核酸”或“核酸分子”指共价结合在一起的两个或更多个核苷酸、核苷或核碱基(nucleobase)(例如脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)的任意链。在一些实施方案中,使用本发明的方法定量的生物分子是核酸分子。核酸分子包括但不限于病毒基因组或其部分(DNA或RNA)、细菌基因组或其部分、真菌、植物或动物基因组或其部分、信使RNA(mRNA)、核糖体RNA(rRNA)、转运RNA(tRNA)、质粒DNA、线粒体DNA或者合成DNA或RNA。可以直链(例如mRNA)、环状(例如质粒)或支链形式以及双链或单链形式提供核酸分子。核酸分子可包含修饰碱基以改变该核酸的功能或行为,例如添加3'-端基双脱氧核苷酸以阻断其它核苷酸被添加到所述核酸中。

[0055] 术语“波长”通常指波的一个峰或峭与下一个峰或峭之间的距离。其等于波速除以波的频率,并且等于波速乘以波的周期。波长是行波和驻波二者以及其它空间波型的特征。波长通常由希腊字母 λ 来表示。假定正弦波以固定的波速移动,则波长与该波的频率成反比。因此,频率较高的波的波长较短,并且频率较低的波的波长较长。

[0056] 术语“波数”是与波长的倒数成比例的波的性质。波数通常以单位 cm^{-1} 测定,并且可被定义为每单位距离的波长的数量,即 $1/\lambda$,其中 λ 是波长。

[0057] 本文使用的术语“(一个或多个)吸收峰面积”指如本文所述将样品暴露于IR光谱法后观察到的红外吸收光谱的一个或多个部分。一旦使用本文所述的基于IR的方法获得红外吸收光谱,则通过绘出横跨所述峰的基线并测定该峰内包围的面积来计算所述光谱中的一个或多个峰下的面积。如图16所示,通常基于光谱上峰前和峰后的点绘制基线。

[0058] 在要求保护的方法的一些实施方案中,峰面积与样品中分析物的浓度或量相关。

[0059] 在一些实施方案中,如下测定样品中蛋白质的浓度。第一步,使用包含已知浓度的蛋白质标准品的校正物生成校正曲线,并且将所述校正曲线预载入IR光谱仪。随后可在每次使用所述仪器定量样品中的蛋白质时使用同一校正曲线。另外,不需要所述校正物存在于被分析的样品中,或者换言之,所述校正物可来自与所述样品完全不同的来源。举例而言,在一具体实施方案中,以各种已知的浓度在缓冲液中准备蛋白质标准品例如BSA的溶液。将该标准品溶液施加到卡片形式的样品架内的膜的亲水区,将该膜干燥并使用IR仪器例如Bruker IR仪器测定吸收光谱。不希望受到理论的约束,任意适合的IR仪器均可用于本发明的方法中。

[0060] 大多数现代IR吸收仪器使用具有迈克耳孙干涉仪的傅里叶变换技术。在所要求保护的方法的一些实施方案中,为了获得IR吸收光谱,所述干涉仪的一面镜子移动从而在到达检测器的辐射中产生干扰。由于所有的波长均穿过所述干涉仪,所以干涉图是复杂图形。从作为镜面移动(cm)的函数的干涉图的傅里叶变换获得作为波数(cm^{-1})的函数的吸收光谱。该设计不具有色散仪器的参比池,所以将参比光谱记录并保存于内存中以从样品光谱中扣除。

[0061] 其它示例性的IR吸收仪器包括色散型IR吸收仪器和单波长IR仪器。色散型IR光谱仪使用单色仪中的衍射光栅以便分散光的不同波长。一般而言,色散型IR光谱仪已被FTIR仪器取代。单波长IR仪器可用于监测单个IR波长以测定快速反应的动力学。

[0062] 在本发明的一些实施方案中,使用FTIR仪器定量一种或多种生物分子。通过内置于该仪器中的软件计算涵盖酰胺I和酰胺II的峰($1800\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$)的曲线下面积。例如,Bruker IR光谱仪包含Bruker Opus软件。然后设置校正曲线,其将峰下面积对蛋白质标准品的浓度作图。接着使用通过已知浓度的标准品生成的校正曲线测定样品中的分析物的浓度。

[0063] 通常,校正曲线是指观察到的信号的期望值与分析物的量或浓度之间的函数关系的图形表示。通常使用涵盖校正物的已知浓度范围的标准品生成校正曲线。然后将用样品获得的光谱与所述标准品比较以获得期望分析物的浓度。

[0064] 在本文所述方法的一些实施方案中,所述方法还包括监测/检测样品中的水分引起的吸收的步骤。水在约 3400cm^{-1} 和 1600cm^{-1} 处具有吸收,因此与用许多生物分子获得的光谱重叠。在本发明的一些实施方案中,使用包含内置软件的IR仪器监测与水分引起的吸收相关的光谱强度的变化,所述光谱强度在样品中的水分的量减少时降低。因此,通过监测与水分相关的光谱强度,使用者可确定所述样品是否需要进一步干燥。通常,在干燥过程中数次测量与水分引起的吸收相关的光谱强度,直到在2次或3次或更多次的连续读数中观察到相同的光谱强度,由此验证该样品对于实际定量是干燥的。

[0065] 在一些实施方案中,使用本发明的方法分析的样品中包含表面活性剂。表面活性剂可包含于被点样到膜上的样品中,或者可在将样品点样前或点样后将其添加到所述膜上。表面活性剂(例如十二烷基硫酸钠(SDS)或吐温 20)或化学添加剂(例如甘油)降低溶液的表面张力,由此使得样品能够在区域内均匀分布。

[0066] 当在亲水性PTFE基质上干燥包含一种或多种生物分子的含水样品时,随着样品的干燥形成浓度梯度。这一沉积模式导致大量的样品被沉积在最外围,并且最小量的样品被沉积在样品区的中心。这一图形通常被称作“咖啡环”或“炸面圈”图形。当(例如通过加入表面活性剂)降低所述含水样品的表面张力时,所述样品的沉积在整个样品区内更为均匀。在样品被能量源辐射的情况中,包含表面活性剂导致所述样品在暴露于该能量源的区域内更均匀的分布。

[0067] 示例性的表面活性剂包括但不限于聚氧乙烯系非离子型表面活性剂,例如吐温20、吐温40、吐温60和吐温80;阴离子型表面活性剂例如十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基硫酸铵、十二烷基醚硫酸钠(SLES)、硬脂酸钠。在一些实施方案中,表面活性剂的浓度为约1%或约2%或约3%或约4%或约5%或约6%或约7%或约8%或约9%或约10%。在一具体实施方案中,表面活性剂的浓度为约5%。

[0068] 示例性的化学添加剂包括但不限于多元醇,例如甘油、乙二醇、丙二醇、双丙二醇。在一些实施方案中,化学添加剂的浓度为约1%或约2%或约3%或约4%或约5%或约6%或约7%或约8%或约9%或约10%。在一具体实施方案中,化学添加剂的浓度为约5%。

[0069] 本发明还包括用于使用基于IR的方法定量样品中的一种或多种生物分子的装置以及制造这样的装置的方法。在本发明的一些实施方案中,用于定量生物分子的装置是包含多孔膜(例如超滤膜或微孔膜)的卡片形式的样品架。一般而言,认为超滤膜具有小于 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 的孔径。

[0070] 在一些实施方案中,包含于样品架内的多孔膜包含被疏水区包围的亲水区。所述亲水区是可被水立即润湿的所述膜的区域以及通常样品被点样或吸移到所述膜上的区域。

其还是通常暴露于IR光束的区域。

[0071] 在一些实施方案中,所述膜的亲水区被未被水润湿的疏水区包围。

[0072] 在一些实施方案中,用于容纳样品的区域包含亲水区和疏水区的形状/图形,例如为在所述亲水区内形成的疏水区的线或点的形式。示例性的形状和图形显示于图10A - 10D 中。这样的形状和图形还使得样品能够在暴露于 IR光束的区域内更均匀地分布,就像添加了表面活性剂或化学添加剂。

[0073] 包含微孔膜的用于红外光谱分析的卡式样品架之前已在本领域中有所记载,例如美国专利第5,470,757号和第5,764,355号中讨论的那些,这些专利以其整体援引加入本文。然而,不存在如本发明中的包含被疏水区包围的用于容纳样品的亲水区的卡式样品架的教导。另外,这些专利也未记载表现出本文所述的改进的卡式样品架和方法,所述改进例如在样品中定量多于一种生物分子、使用非常小的样品体积和无需在每次操作时生成校正曲线等。

[0074] 所述卡片形式的样品架通常由用粘合剂层压到膜基质上的两层纸卡材料制成。还可由任意其它物质(例如可用粘合剂粘着的塑料)制造样品架。另外,可在不使用任何粘合剂的情况下构成样品架,并通过当暴露于热时粘附到卡材料上的所述卡材料上的涂层对其进行层压。在一些实施方案中,样品架的形式为约1.4英寸宽、2.5英寸长的卡片,并且可容纳至少4个样品。然而,可设计样品架使其可容纳1个样品至多达96个或更多个样品(例如96-孔板形式)。特别是当样品架是卡片形式时,可在其设计中加入刻痕以便对IR系统定位所述样品架,从而确认所述样品架被正确地插入所述IR 系统的支架(carrier)内以暴露于IR光束。将样品架正确定位使得IR光束穿过包含样品的亲水区也是重要的。

[0075] 本文所述的卡式样品架易于生产、成本低并且是一次性的。

[0076] 通过以下实施例(其不应被解释为具有限制性)进一步举例说明本发明。本申请中通篇引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图均援引加入本文。

[0077] 实施例

[0078] 实施例1:生成用于将来的样品定量的校正曲线

[0079] 本文描述的定量样品中的一种或多种生物分子的方法避免了每次在仪器上进行定量实验时生成校正曲线的需要。这与使用者通常需要在每次进行定量测定时生成新的校正曲线或标准曲线的本领域的现有测定法相比有所改进。

[0080] 在本文描述的方法中,使用者生成一次校正曲线或标准曲线并且可将其用于将来的分析。在一项实验中,如下生成校正曲线。在缓冲液中准备分析物(BSA)的各种浓度的溶液并且采用本文所述的基于FTIR的检测法进行分析。图1中的图显示与分析物的浓度或量(X轴)相对的峰面积或峰高(Y 轴)。当已知峰面积时,将该校正曲线的线性范围用于计算未知样品的浓度。

[0081] 典型的等式是 $y=mx+c$,其中 $c=Y$ 轴上的截距, $m=$ 线的斜率; $y=$ 峰面积或峰高,并且 $x=$ 分析物的浓度或量。另外,使用者可向原始校正曲线添加数据来增强定量的统计学相关性。

[0082] 图1是某一天使用缓冲液中各种已知浓度的BSA生成的校正曲线,以及在数天后根据同一曲线定量未知浓度蛋白质的相关样品的实例。

[0083] 实施例2:定量样品中的生物分子的一般方案

[0084] 在代表性的实验中,在去离子水或适合的缓冲液中准备包含一种或多种生物分子(例如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质等)的样品。将约0.2-10 μl 的空白溶液(例如单独的去离子水或缓冲液)施加到包含于例如卡片形式的样品架(在本文中称作卡式样品架)内的膜的亲水区。将相同体积的所准备的样品溶液施加到一个或多个点样孔中,所述点样孔可存在于同一卡式样品架上或存在于并非同一个但相同的卡式样品架上。接着采用以下技术中的一种将所述卡式样品架干燥:加热(40-60 $^{\circ}\text{C}$, 0.5-2分钟);压缩空气/氮气或任意其它惰性气体(0.5-2分钟);或微波炉。随后将干燥的卡式样品架插入IR仪器的样品室内。在4000-400 cm^{-1} 下测定空白溶液的透射/吸收光谱以获得本底谱图,然后在相同的波长范围下测定所述样品。接着使用内置于所述系统中并使用各种浓度的标准品生成的校正曲线测定未知样品的浓度。

[0085] 图2显示具有用于施加空白的一个点样孔(以B表示)和用于施加3个样品(以1、2和3表示)的点样孔的示例性卡式样品架的图像。然而,如上文所述,卡式样品架可被设计成具有任意数量的用于施加样品的点样孔的形式。

[0086] 实施例3:使用IR光谱法定量样品中的蛋白质和核酸

[0087] 在代表性的实验中,使用本发明的方法如下定量样品中的蛋白质和核酸二者。

[0088] 在一项实验中,将牛血清白蛋白(BSA;SIGMA Cat#A-7030)和脱氧核糖核酸(DNA; Ambion Cat#AM9680剪切的鲑精DNA)以不同的比例(10-1 μg ,以等比和反比)混合在一起并溶解于1xPBS缓冲液中。在如图2所示的卡式样品架的1、2和3位置,使用P10Rainin移液器将1 μl 样品吸移到卡式样品架的亲水性PTFE膜上。将相同体积的用于准备上述样品的缓冲液吸移到如图2所示的卡式样品架的B位置。

[0089] 用高压空气干燥包含缓冲液点样孔和样品点样孔二者的卡式样品架。将所述卡式样品架插入IR仪器中,并且首先在4000-400 cm^{-1} 下测定缓冲液的吸收/透射光谱。随后,使用缓冲液光谱作为本底谱图测定样品的光谱。采用用于蛋白质的1700-1400 cm^{-1} 的光谱范围以及用于核酸的1740-1400 cm^{-1} 和1120-940 cm^{-1} 的光谱范围测定蛋白质和核酸的量。应注意蛋白质和核酸均在1700-1400 cm^{-1} 的波长范围内有吸收。因此,一旦测定了核酸的浓度,则可将其从利用1700-1400 cm^{-1} 的峰面积获得的蛋白质加核酸的浓度中扣除,由此提供单独的蛋白质浓度。因此,可在一次实验中测定蛋白质和核酸二者的浓度。在该实验中,使用溶解于缓冲液或去离子水的纯的蛋白质和DNA样品独立地生成用于蛋白质和DNA的校正曲线。一项这样的实验的结果显示于图3中。

[0090] 实施例4:使用IR定量样品中的肽

[0091] 在另一项代表性的实验中,证明本发明的方法可用于定量肽。在一项实验中,将肽样品溶解于水中达到1mg/ml的浓度。使用P2Rainin移液器将2 μl 体积的该样品吸移到如图2所示的包含亲水性PTFE膜的卡式样品架上,并在40 $^{\circ}\text{C}$ 的加热器内干燥。所述同一卡式样品架还具有被称作空白的位置(B),向其中吸移2 μl 体积的其中未溶解样品的水。将该卡片插入IR 仪器中并测定水/缓冲液空白的吸收/透射光谱,然后使用该水/缓冲液光谱作为背景测定所述样品。使用1700-1400 cm^{-1} 的光谱范围测定肽的量。使用缓冲液/水中的纯BSA样品作为校正物生成校正曲线。该实验的结果显示于图4中。

[0092] 实施例5:使用IR定量样品中的脂多糖

[0093] 在代表性的实验中,将本发明的方法用于定量样品中的脂多糖。具体而言,将诸如

内毒素的脂多糖(脂多糖(LPS);SIGMA L2630)溶解于1xPBS 缓冲液中以获得20mg/ml的储备溶液。使用P2Rainin移液器将2 μ l体积的样品吸移到如图2中的图像所示的包含亲水性PTFE膜的卡式样品架上,并使用40℃的加热器干燥。所述同一卡式样品架还具有被称作空白的位置(B),向其中施加2 μ l体积的其中未溶解样品的缓冲液。将该卡式样品架插入IR仪器中,并且首先测定缓冲液的光谱,然后将该空白缓冲液光谱视作本底谱图测定所述样品的光谱。基于储备溶液的计算记录LPS稀释物的滴定(titration)从而获得校正曲线。一项这样的实验的结果显示于图5中。

[0094] 实施例6:使用IR监测样品中是否存在水分

[0095] 本文所述的方法还可用于检测样品中是否存在水分。由于水分能够影响生物分子定量的准确度(例如在定量蛋白质/肽的情况下更是如此),因此非常不希望使用基于IR的方法分析的样品中含有水分。

[0096] 在代表性的实验中,将2 μ l BSA(Sigma Cat#A-7030)在Milli Q水中的 10mg/ml溶液施加到包含于例如卡片形式的样品架(本文中被称作卡式样品架)中的膜的亲水区。

[0097] 然后将湿样品置于IR光谱仪的IR光束内,并测定IR吸收光谱。当例如由于水分的蒸发引起信号强度和信号形状变化时记录吸收光谱。

[0098] 当所述吸收光谱的信号强度在3次连续测定中保持恒定时,则认为该样品是干燥的,并且用软件(例如Bruker仪器内的Opus软件)采集BSA在 4000-400 cm^{-1} 下的吸收光谱,并使用内置的校正曲线测定该溶液中的BSA 浓度。一项这样的实验的结果显示于图6中,其显示干燥样品时与水分相关的信号强度的降低。

[0099] 实施例7:表面活性剂对样品分布的作用

[0100] 水溶液可能具有难以均匀干燥和难以在暴露于IR光束的膜区域上获得均匀分布的问题。

[0101] 该实验证明向样品中加入表面活性剂导致所述样品在暴露于IR光束的区域上均匀地分布并因此导致更准确的定量。在一项代表性的实验中,使用5 μ l 10mg/ml细胞色素C蛋白质样品溶液,将其溶解于PBS中,并在加入和不加入5%SDS的情况下干燥。将该样品点到卡式样品架上,并置于总直径为4.5mm的IR光束内。

[0102] 观察到仅有约10%的不含SDS的样品吸收所述IR光束,因为大多数的样品被容纳在样品区的外围1mm内。然而,在存在SDS的样品中,由于所述样品在所述光束的最大辐照度($1/\text{e}^2$)之内,因此所述样品的更加均匀的分布导致更多的IR吸收。经积分的酰胺1和2的峰面积(1725-1479 cm^{-1}) 约为不含SDS的样品的3倍。一项这样的实验的结果显示于图7中。该IR 吸收光谱中的X轴表示波数(cm^{-1}),而Y轴表示吸光度单位。

[0103] 实施例8使用等离子体处理制造用于容纳样品的卡式样品架

[0104] 本发明还包括可用于本文所述的用于定量样品中的一种或多种生物分子的方法中的样品架。在一些实施方案中,样品架为卡片形式,并且为方便起见被称作卡式样品架。为了获得准确的吸收光谱并由此定量一种或多种所关注的生物分子,所述卡式样品架必须能够将样品容纳于IR光束内。

[0105] 在一种制造用于本发明方法中的卡式样品架的方法中,利用真空等离子体环境生成用于容纳样品的区域。用于所述卡式样品架的原料膜是由 Sumitomo以商品名Poreflon销售的亲水性PTFE膜。该膜包含平均孔径为 0.03 μm (HPSW-005-30) 的孔,并且经亲水化处

理涂布以获得可被水润湿的表面。将所述Poreflon亲水膜暴露于真空等离子体环境以清除表面的所述处理,曝露出原本的疏水性PTFE。

[0106] 图8A和8B分别显示遮蔽固定装置的实验性敞开视图和闭合视图,在所述遮蔽固定装置内放置了用以暴露于等离子体的组装好的卡式样品架。将所述膜装配于由两张硬质的涂布有粘合剂的纸板组成的卡片内,各纸板的中心具有12.5mm的通孔。将两张纸板与放置在它们中间的Sumitomo 亲水膜组装到一起,由此覆盖了所组装纸卡中的孔。组装卡(10)显示于图 8A中,其中固定装置(12)为敞开结构。将包含亲水膜(14)的组装卡(10)放置于包含用于将所述卡片置于中心的框架(16)的遮蔽固定装置(12)内,如图8A 和8B所示。在被置于中心且被放置的膜卡片(10)的相对两侧存在弹性密封圈(18)。在该弹性密封圈(18)周围有4个孔(19),其提供等离子体气接近待处理膜(14)的通道。接着如图8B中的横截面示图所示,将遮蔽固定装置(12) 闭合,使得弹性密封圈(18)在压力下密封卡片(10)内的膜(14)的相对两侧。使用例如通过夹子产生的力使固定装置(12)在包含亲水膜(14)的卡式样品架(10)上闭合。

[0107] 接着将置于固定装置(12)内的卡片(10)置于真空等离子体环境中,其闭合状态的横截面示图显示于图8B中。可使用的示例性真空等离子体系统是 PDC-001型Harrick真空等离子体系统。使用真空泵(未显示)将该系统内的室(20)抽成真空。使大气进入室(20),并将流速维持在约2-5cc/min。向RF 发生器(未显示)通电并维持约10秒至7分钟的一段时间。保护弹性密封圈 (18)之间的卡式样品架(10)的膜(15)的区域以免其暴露于接触等离子体,而其余的外部则暴露于以点表示的等离子体。

[0108] 使用图8A和图8B描述的固定装置的等离子体暴露实验表明任意长于 1分钟的处理时间导致明确地限定出亲水区和疏水区,在弹性密封圈(18)的位置出现清晰的过渡边界。短于1分钟的等离子体处理时间导致模糊的过渡边界乃至根本无过渡边界,得到仍保持亲水性的膜和未被容纳的样品。

[0109] 图9显示使用该实施例中描述的方法制造的示例性的卡式样品架(22),其包含具有被疏水区(26)包围的亲水区(24)的膜。两个区域之间的界限是过渡边界或过渡线(28)。

[0110] 如上文所述,还需要使样品尽可能均匀地分布在IR光束内。如上文所述,一种实现均匀分布的方法是向样品中加入表面活性剂。另一种实现均匀分布的方法是在所述膜上形成如本文所述的散布于亲水区的疏水区的图形/形状。

[0111] 应当理解,干燥中的液滴会优先沿着该干燥中的液滴的外围沉积样品,例如通常观察到的咖啡环现象。为了将这一干燥图形最小化,可进一步改进包围亲水区的疏水区。这可通过例如以在膜上生成亲水区内的疏水点或疏水线的图形的方式适当地在所述膜上放置所述弹性密封圈来实现。这样的图形预期得到多个较小的液滴,由此形成越来越小的干燥图形。这些较小的干燥图形以更均匀的构造将样品沉积于IR光束内。应当理解,可在所述膜上构造的可能的形状/图形可为线形、点形、星形和其它常见形状的形式。另外,所述外围疏水区的形状还可以是星形、方形等。可通过将所述弹性密封圈适当地放置在固定装置上而生成的示例性的疏水/亲水图形显示于图10A-10D中。编号30表示亲水区,而编号32表示疏水区。

[0112] 实施例9:使用热处理制造用于容纳样品的卡式样品架

[0113] 在另一项实验中,使用热处理作为在所述卡片内的膜上实现样品容纳的另一替代

方法,如下制造用于本发明的IR方法中的卡式样品架。

[0114] 在示例性的实验中,为了形成用于容纳样品的区域,通过暴露于热板来改变亲水性PTFE膜的表面润湿性。所使用的亲水性PTFE膜由Sumitomo 以商品名Poreflon销售,其具有平均孔径为 $0.05\mu\text{m}$ 的孔(HHPSW-005-30),并且经亲水化处理涂布以获得可被水润湿的表面。一般而言,使用该实施例中描述的方法时,可使用热板改性孔径为 $0.05\mu\text{m}$ - $0.45\mu\text{m}$ 且厚度为 $30\mu\text{m}$ - $80\mu\text{m}$ 的任意Poreflon膜。

[0115] 与实施例8中相同,将亲水性PTFE膜装配于由具有四个10mm通孔的涂布有粘合剂的纸板组成的卡片内。将两张纸板与放置在它们中间的 Sumitomo亲水膜组装到一起,由此覆盖所组装纸卡中的孔。将包含亲水膜 (36) 的组装卡 (34) 放入凸起固定装置 (38) 内,所述固定装置 (38) 包括与热棒 (cal-rod) (未显示) 结合的气缸 (未显示) 和热板 (42),如图11所示。所述气缸将热板 (42) 置于卡式样品架 (34) 内的膜 (36) 上或其上方,并且底座 (nest) (40) 上的弹性垫 (44) 支撑该膜 (40) 的底面。热板 (42) 包含凸起结构 (46),并且底座 (40) 包含与凸起结构 (46) 对齐的弹性垫 (44),当将卡式样品架 (34) 置于它们之间时导致与热板 (42) 直接接触的区域变成疏水性的。

[0116] 凸起固定装置/卡/热板组件的敞开和闭合横截面示图分别显示于图 12A和12B中。

[0117] 将热板 (42) 暴露于膜 (36) 一段固定的时间 (例如5秒至5分钟) 后,所述气缸 (未显示) 将热板 (42) 从膜卡 (34) 上移除。

[0118] 同样如实施例8中的情况,可改变容纳区域的形状。例加在热处理的情况下,可通过与膜非常接近的突起结构和弹性垫的形状来控制容纳区域的形状,使得与热板的凸起结构接触的膜的部分变成疏水性的,而未与热板接触的部分仍为亲水性的。

[0119] 为了证实使用实施例8中描述的等离子体处理或使用本实施例中描述的热处理生成的疏水区可有效地容纳样品,使用水作为样品来研究经热处理或等离子体处理的膜和未经处理的膜的样品容纳性质。图13A-13B显示未经热处理或等离子体处理的膜的样品容纳性质,并且图13C和13D显示经热处理或等离子体处理的膜的样品容纳性质。将作为样品的 $2\mu\text{l}$ 体积的水 (50) 点样到卡式样品架 (54) 的亲水膜 (52) 上。图13A显示时间为0时的水样品 (50),并且图12B显示时间为30秒时的水样品 (50)。如图13B所示,所述水样品在整个膜区域扩散,导致被润湿的区域的直径大于IR光束的直径。而在经热处理或等离子体处理的膜的情况中,如图13C和13D所示,在时间为0 (图13C) 和30秒 (图13D) 时,水样品 (50) 被容纳于被疏水屏障区 (58) 包围的膜的亲水区 (56) 内。因此,如本文所述的热处理或等离子体处理可用于生成被外部疏水屏障区 (56) 包围的内部亲水区 (56)。

[0120] 实施例10:通过化学或物理破坏实现样品的均匀分布

[0121] 人们已观察到在干燥用于FTIR分析的含水生物样品时常常得到不均匀的样品分布图形,其中最高的样品浓度位于样品区的外缘,由此形成所谓的“咖啡环”或“炸面圈”图形,其可导致不准确的定量。

[0122] 在本文描述的代表性的实验中,使用表面活性剂或去污剂通过使样品在样品容纳区内以更均匀的模式干燥而得到更为均匀的样品分布,如图 14A所示。而且,在样品区内加入疏水屏障图形 (例如“X”交叉图形) 能够使样品更倾向所述样品区的中心干燥,如图14B所示,得到与使用表面活性剂添加剂的作用接近的样品分布。所述样品的分布或对“咖啡环”

的破坏得到更高的浓度和更低的变动系数百分比(%CV)。

[0123] 可使用的表面活性剂的实例包括但不限于吐温20和十二烷基硫酸钠(SDS)。在一项实验中,已证明干燥的细胞色素C样品的环状图形随溶解有样品的溶液(例如PBS相对于H₂O)而变化。IR光束内样品分布的差异可影响所述IR光束穿过所述样品的透射。为了干扰所述环状图形从而得到更均匀的样品分布,可将去污剂或表面活性剂加入到样品中或直接加入到样品被点样于其上并干燥的膜上。

[0124] 在下表1中,在不存在SDS(仅H₂O)和存在SDS(1%和5%)的情况下计算细胞色素C蛋白质的酰胺1和2的峰面积。加入SDS导致计算的样品面积增加以及变异系数百分比(%CV)降低(例如从9.1%降低至2.3%)。

[0125] 图15显示在下表1和表2中所示的汇总数据的柱状图。加入SDS引起的样品值的增加和%CV的降低归因于更均匀的样品分布(更多的样品在总IR光束内)以及更低的存在于样品之间的变异性(均匀的样品分布相对于形成环情况下的差异)。

[0126] 使用OPUS 6.5软件(Bruker)计算表1和表2中的B列的酰胺1和2的峰面积。计算平均值和%CV。向样品中加入SDS(1%和5%),并且再次分析峰面积和%CV。

[0127] 表1:

[0128]

蛋白质	量 [mg/ml]	体积 (μ l)	添加物	量(%)	样品	B 酰胺 1&2	
细胞色素 C	10	2	dH ₂ O		1	6.137	
细胞色素 C	10	2	dH ₂ O		2	5.225	
细胞色素 C	10	2	dH ₂ O		3	5.309	
						5.557	= 平均值
						0.504	标准差
						9.1	= % CV
细胞色素 C	10	2	SDS	1	1	9.969	
细胞色素 C	10	2	SDS	1	2	9.525	
细胞色素 C	10	2	SDS	1	3	9.802	
						9.765	= 平均值
						0.224	标准差
						2.3	= % CV
细胞色素 C	10	2	SDS	5	1	24.156	
细胞色素 C	10	2	SDS	5	2	24.045	
细胞色素 C	10	2	SDS	5	3	22.745	
						23.649	= 平均值
						0.785	标准差
						3.3	= % CV

[0129] 表2:

[0130]

蛋白质	量 [mg/ml]	体积 (μ l)	变化	样品	酰胺 1&2	
细胞色素 C	10	5		1	21.352	
细胞色素 C	10	5		2	20.783	
细胞色素 C	10	5		3	24.802	
					22.312	= 平均值
					2.175	标准差
					9.7	= % CV
细胞色素 C	10	5	X	1	24.526	
细胞色素 C	10	5	X	2	23.599	
细胞色素 C	10	5	X	3	23.877	
					24.001	= 平均值
					0.476	标准差
					2.0	= % CV

[0131] 本申请通篇引用的所有参考文献、专利和公布的专利申请的内容均援引加入本文。

[0132] 结合本说明书中引用的参考文献(援引加入本文)的教导可获得对本说明书最充分的理解。本说明书中的实施方案提供对本发明实施方案的举例说明,而不应被解释为限制本发明的范围。本领域技术人员会容易地认识到本发明包括许多其它实施方案。所有的出版物和发明以其整体援引加入本文。在援引加入本文的内容与本说明书之间存在矛盾或不一致的情况下,以本说明书为准。本文中对任何参考文献的引用并非承认这样的参考文献是本发明的现有技术。

[0133] 除非另外指明,本说明书和权利要求书中使用的表示成分、细胞培养物、处理条件等的量的所有数字应被理解为在所有情况下均由术语“约”来修饰。因此,除非有相反说明,数字参数为近似值,并且可随本发明试图获得的期望性质而变化。除非另外指明,出现在一系列要素之前的术语“至少”应被理解为指所述系列中的每一个要素。本领域技术人员仅使用常规实验就会认识到或者能够理解本文所述的本发明具体实施方案的许多等同实施方案。所附权利要求旨在涵盖这样的等同实施方案。

[0134] 本领域技术人员会清楚,可在不偏离本发明的精神和范围的前提下对其做出许多修改和改变。本文描述的具体实施方案仅用于举例说明,而并非意味着其以任何方式进行限制。应将本说明书和实施例仅视作示例性的,而所附权利要求指明本发明真正的范围和

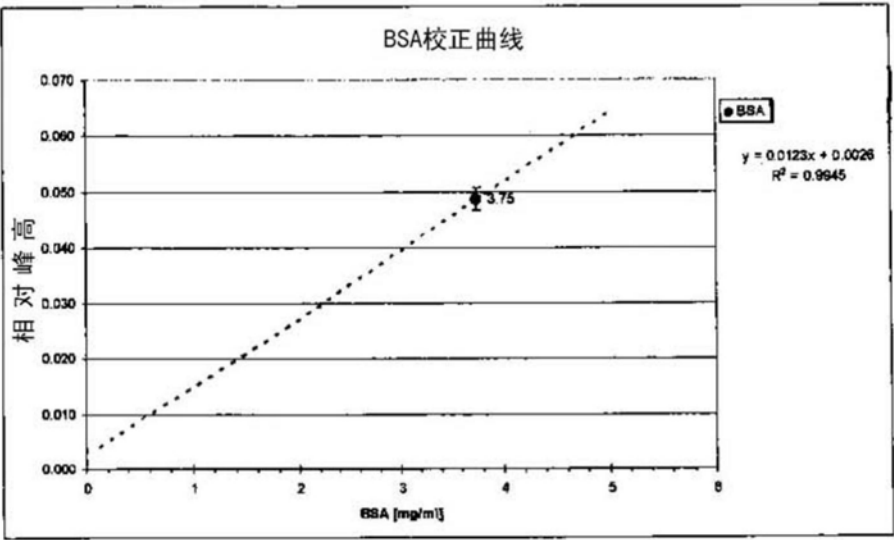


图1

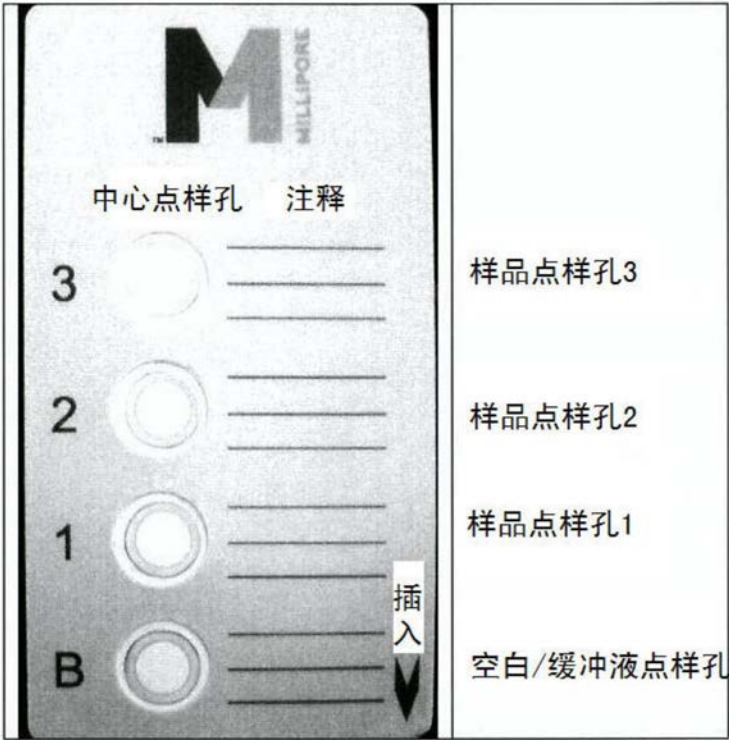


图2

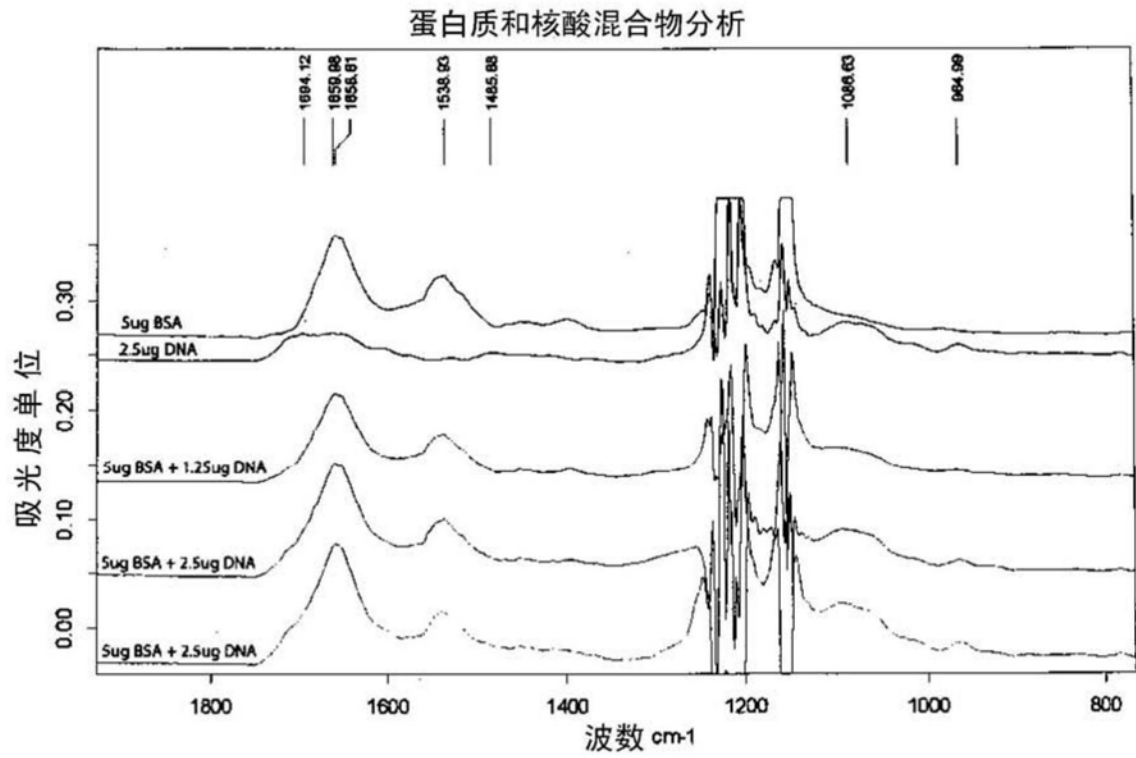


图3

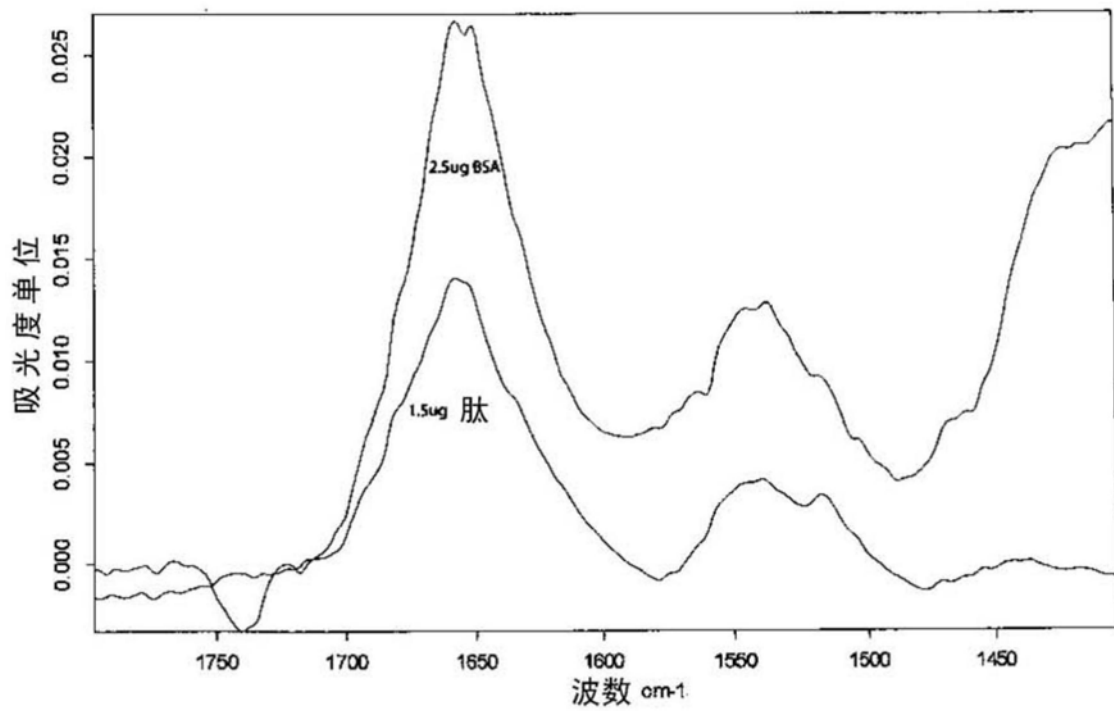


图4

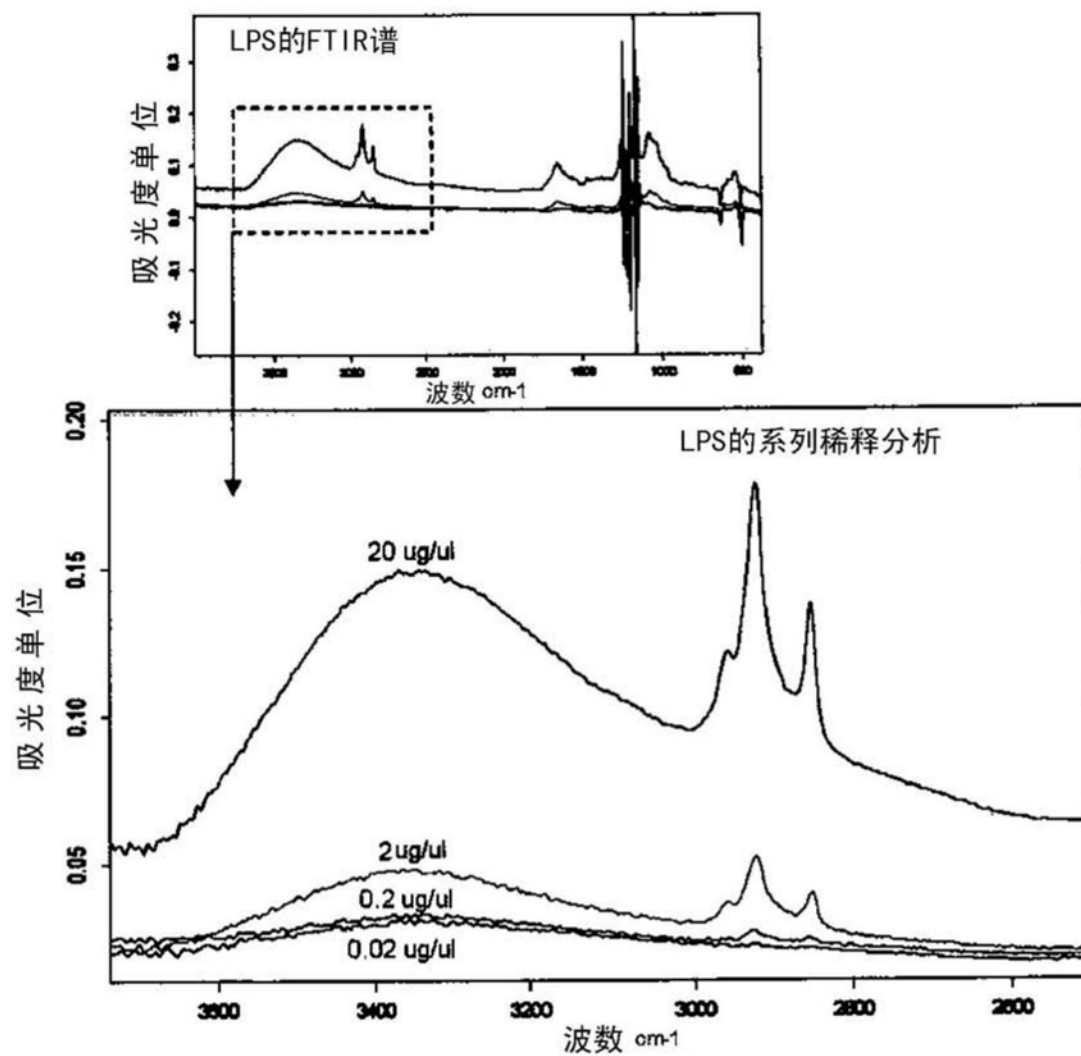


图5

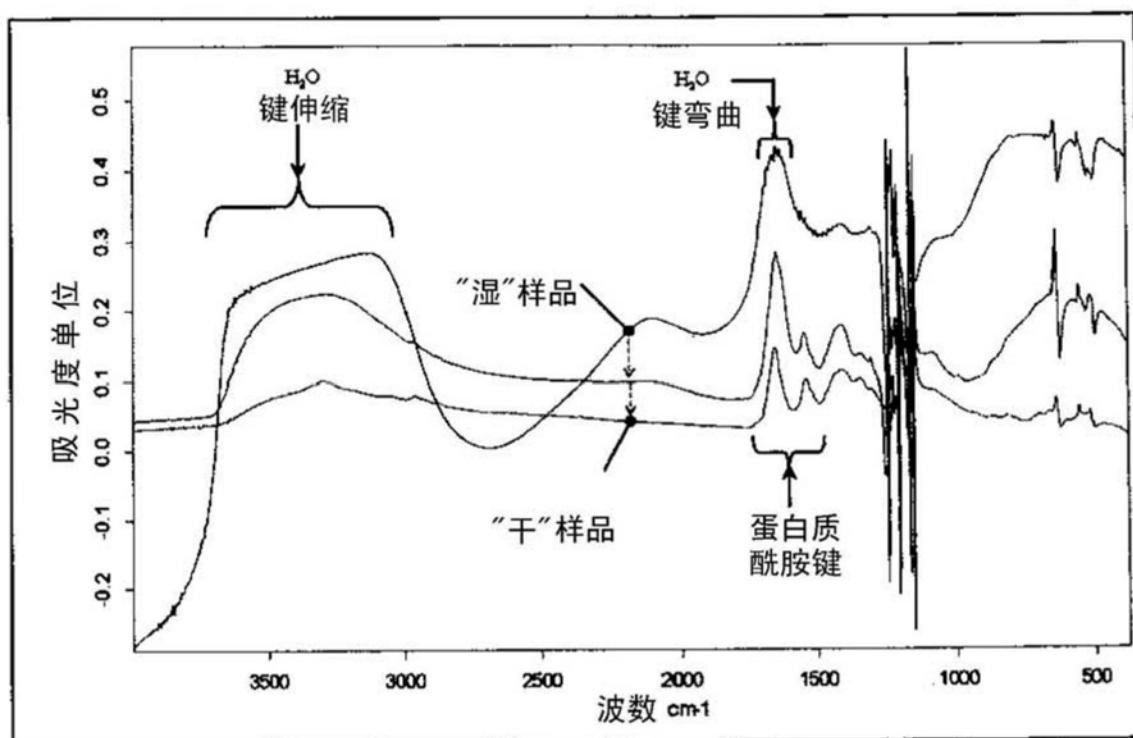


图6

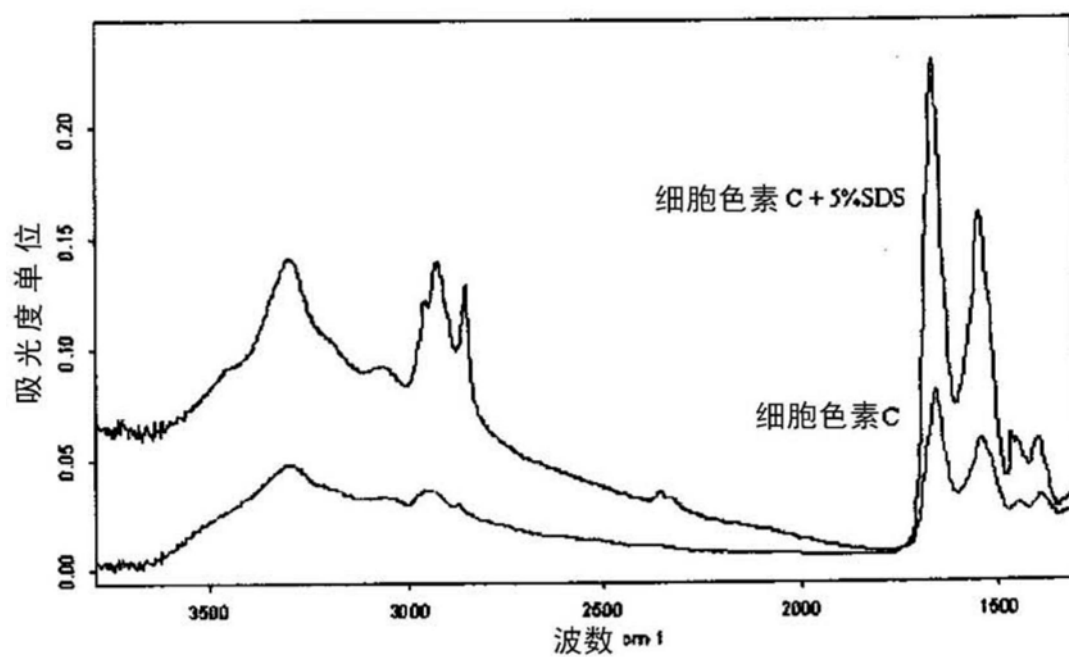


图7

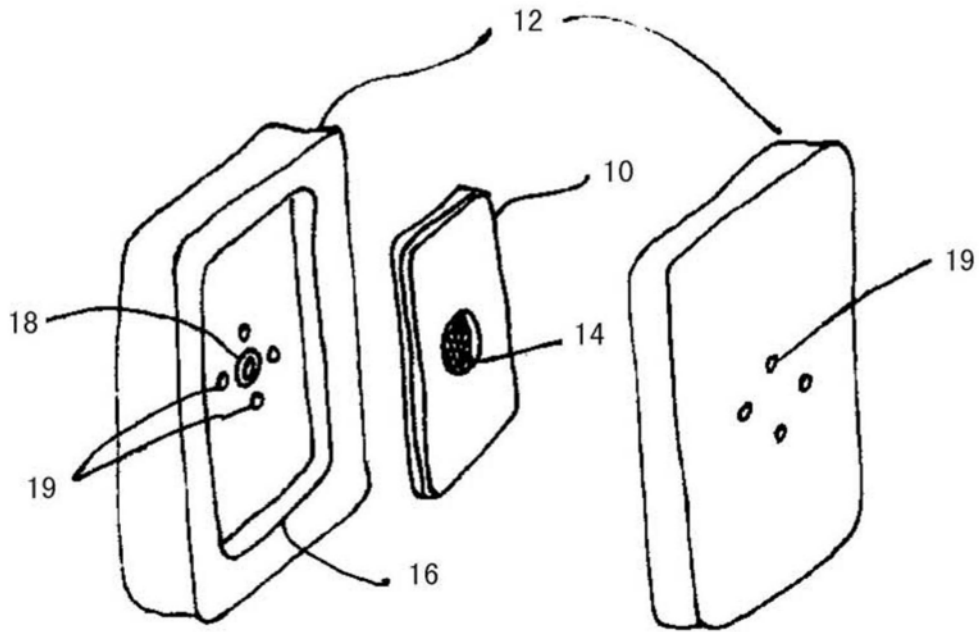


图8A

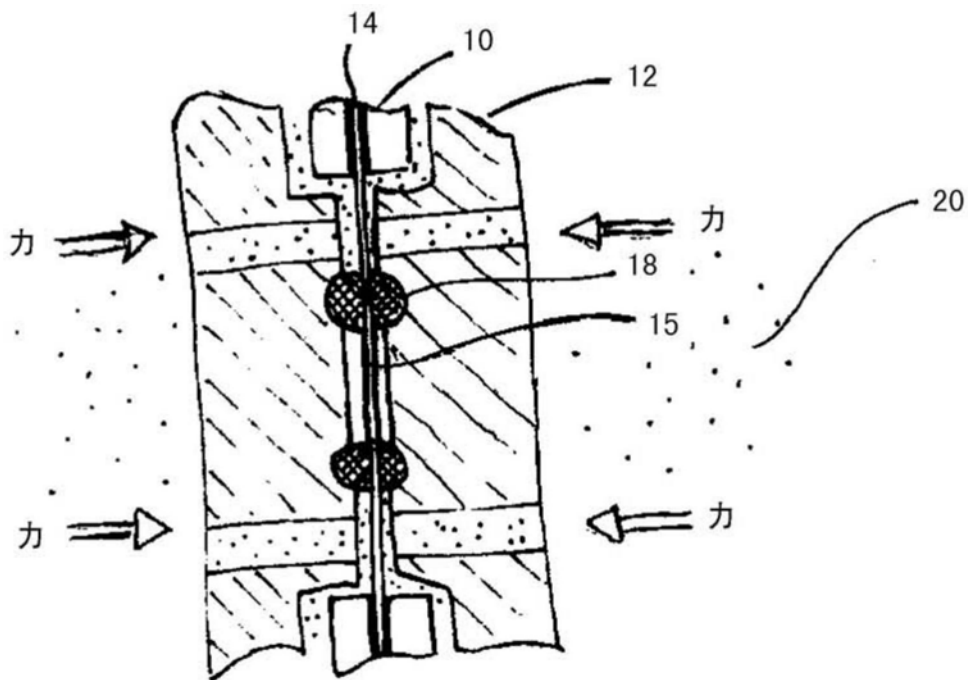


图8B

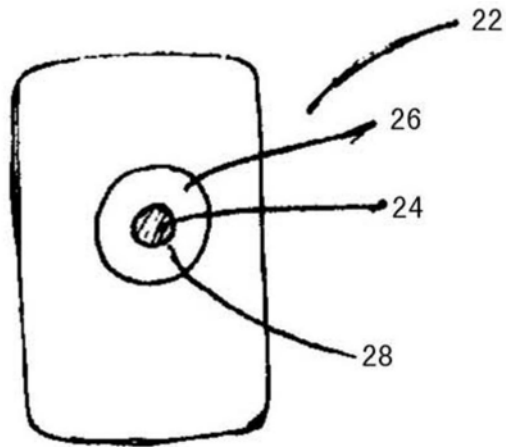


图9

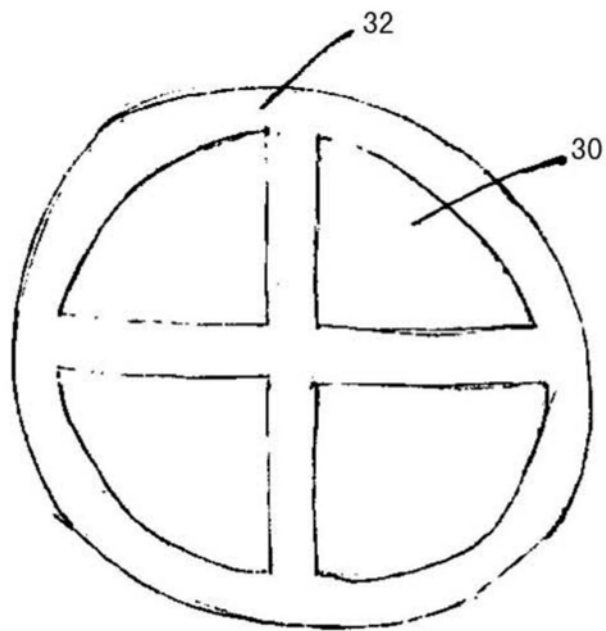


图10A

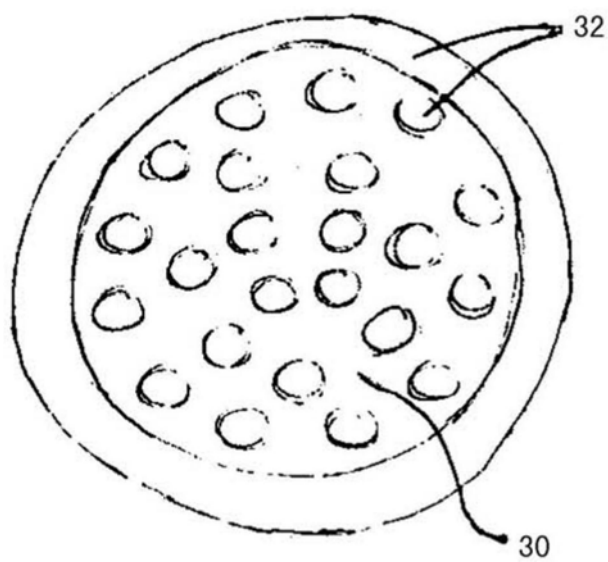


图10B

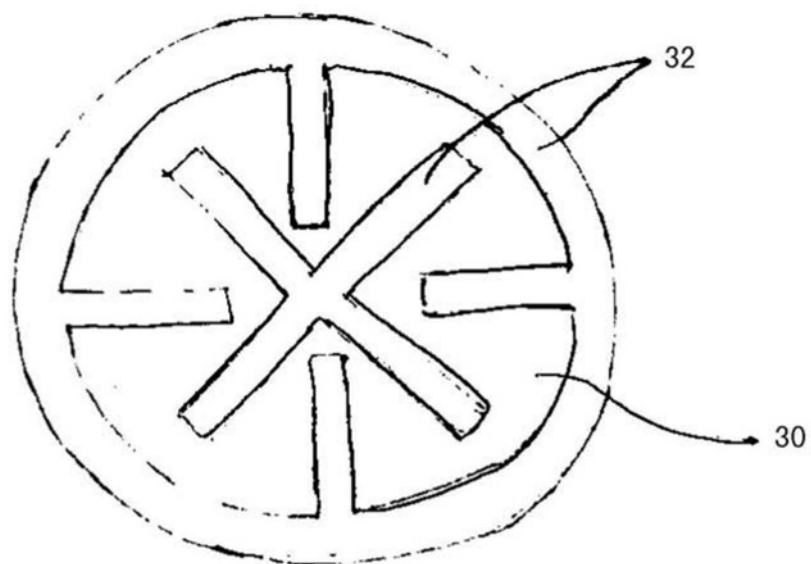


图10C

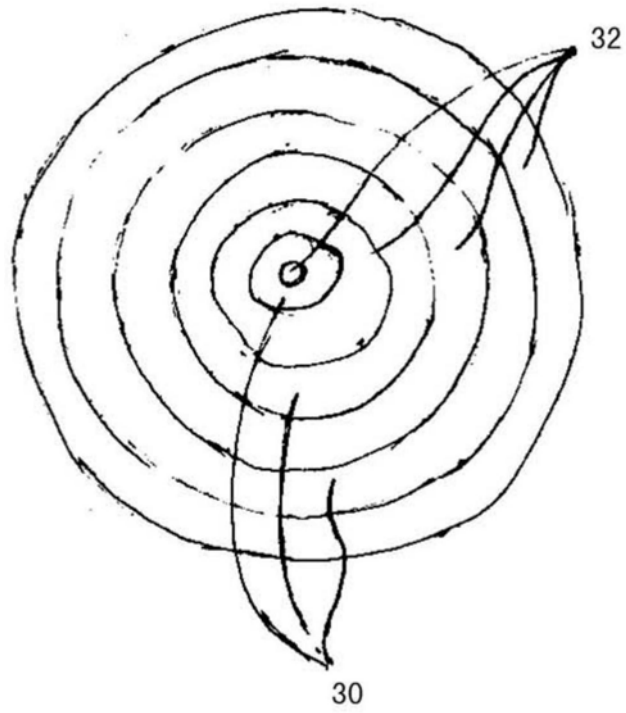


图10D

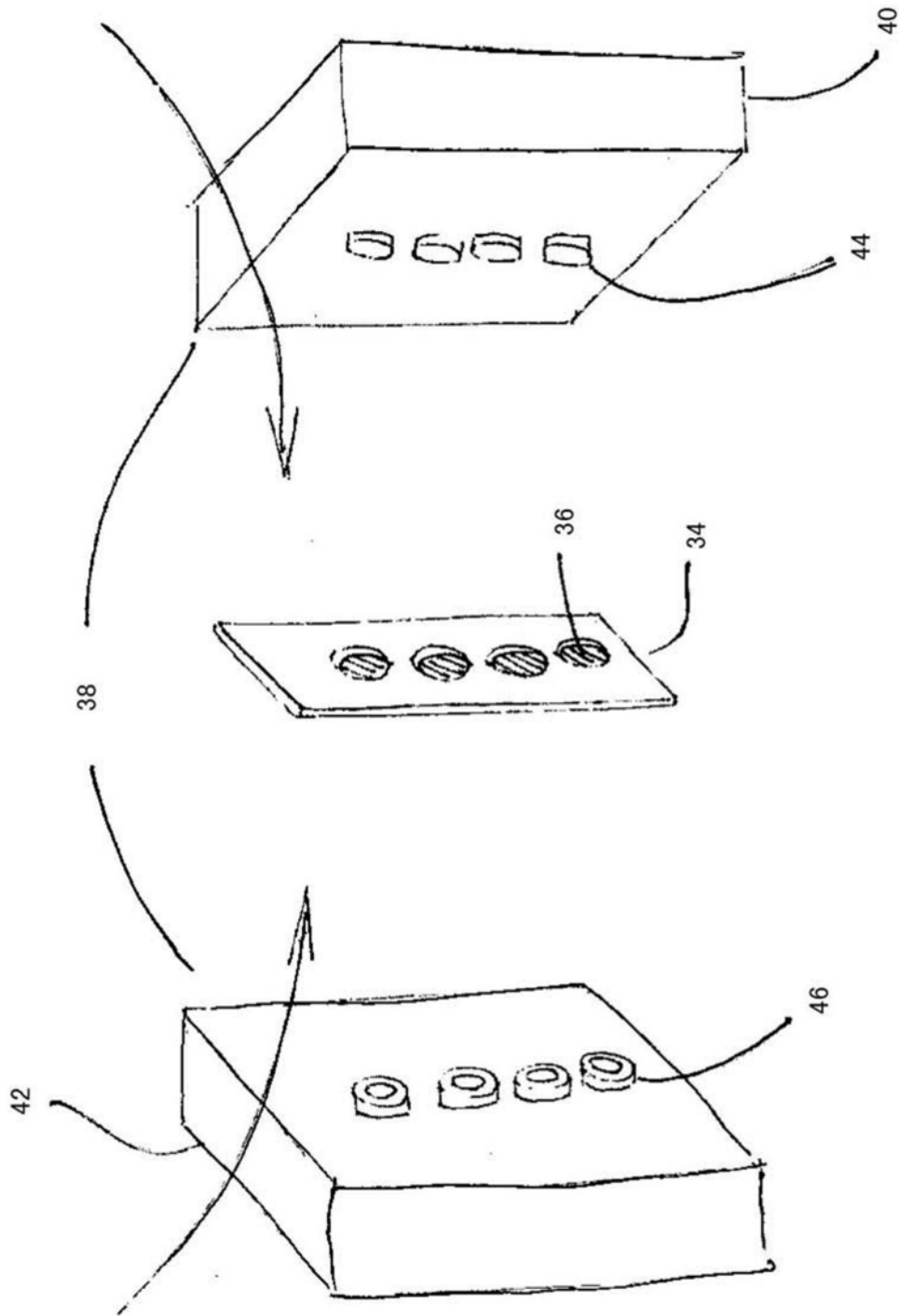


图11

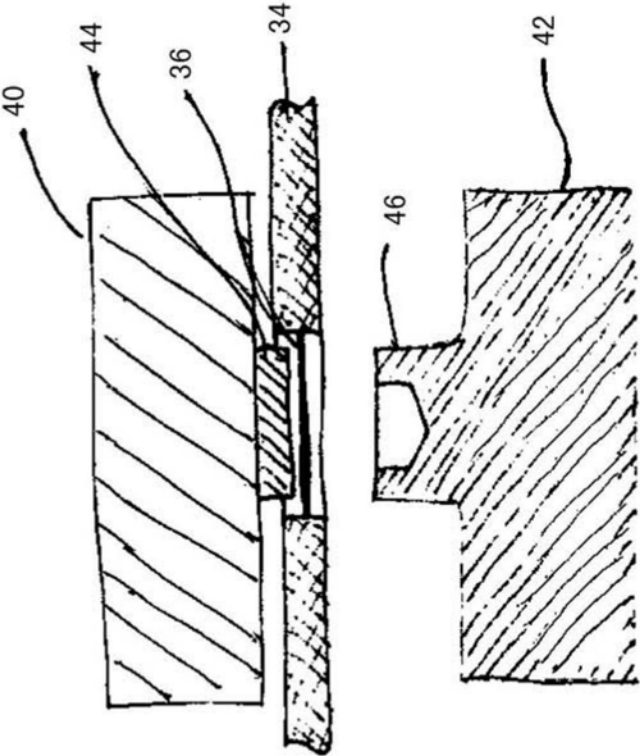


图12A

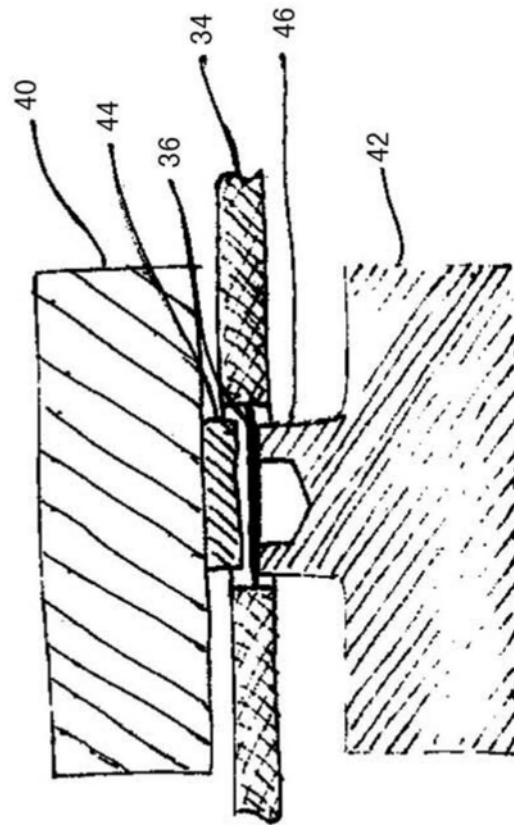


图12B

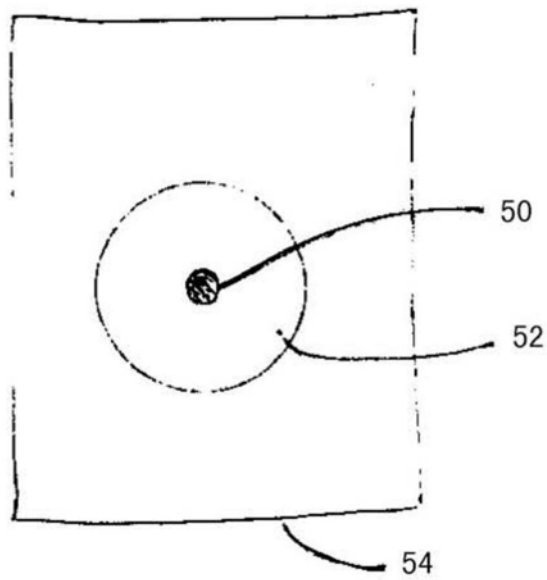


图13A

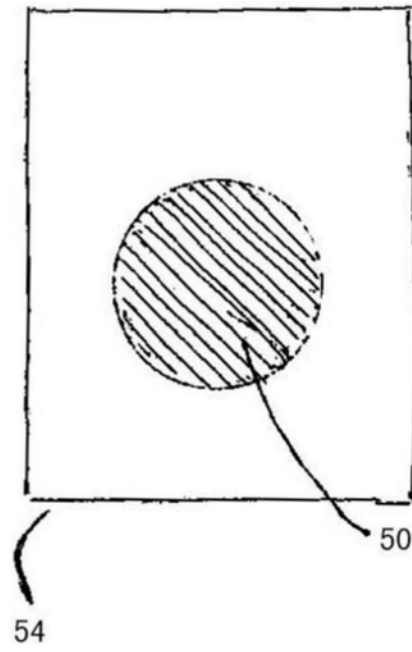


图13B

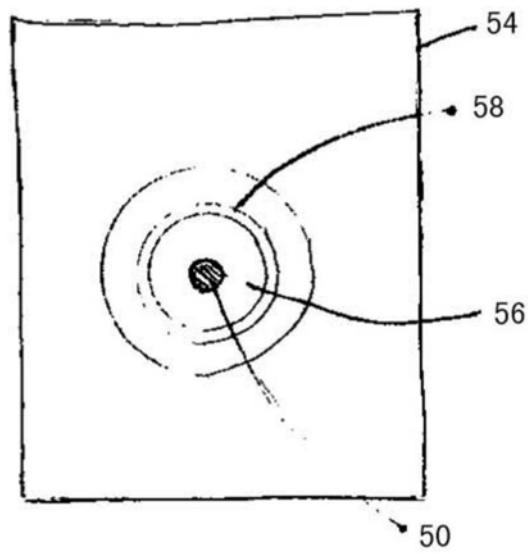


图13C

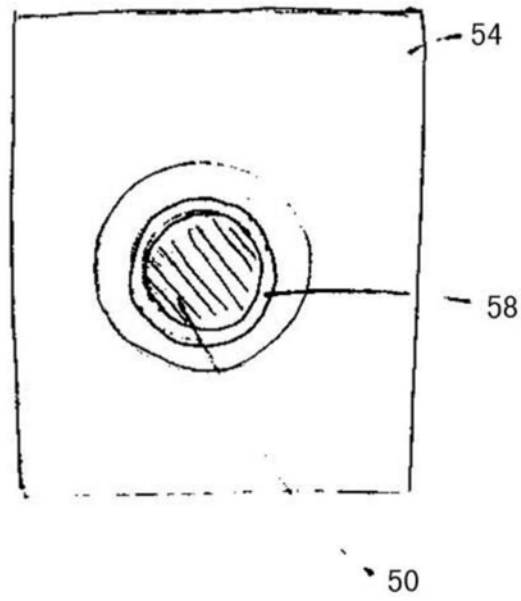


图13D



图14A

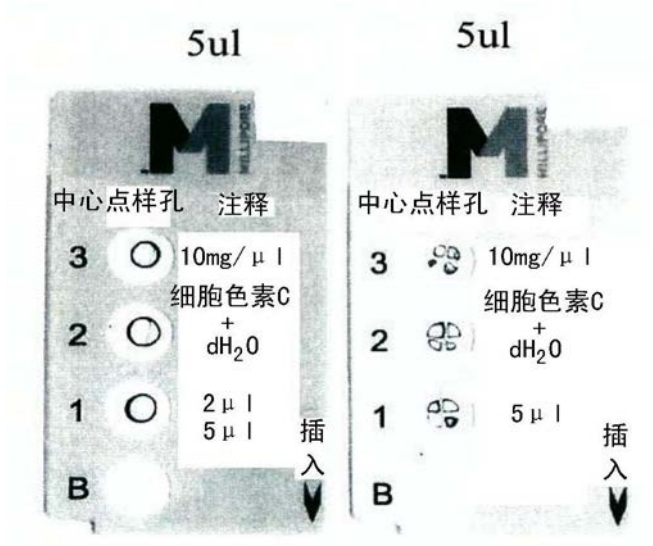


图14B

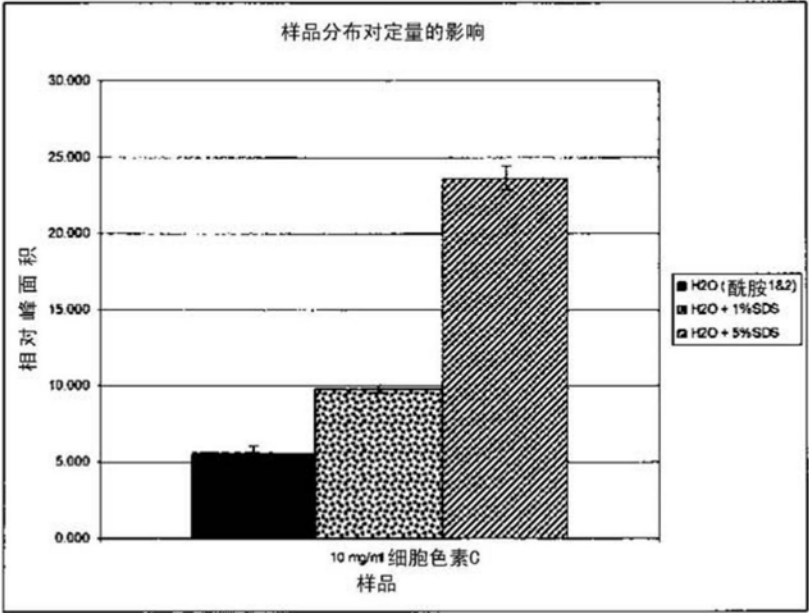


图15

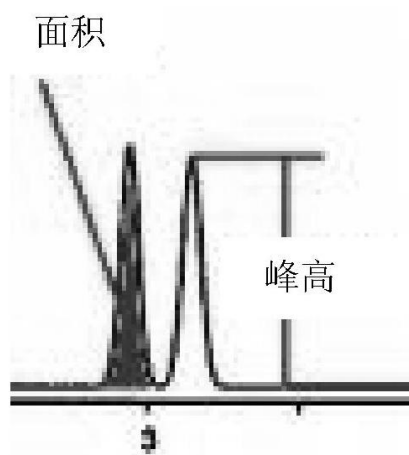


图16