(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 992 713**

(51) Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2012 E 14191434 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024 EP 2835638**

(54) Título: **Retenedor de membrana de transferencia para realizar inmunoensayos, su uso y método para realizar inmunoensayos asistidos por vacío con el retenedor**

(30) Prioridad:

11.05.2011 US 201161484701 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2024

(73) Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US

(72) Inventor/es:

SCOTT, CHRIS;
CLARK, PHILLIP;
GREENIZEN, KURT E.;
AMARA, RYAN A. y
COLONNA, ROBERT

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Retenedor de membrana de transferencia para realizar inmunoensayos, su uso y método para realizar inmunoensayos asistidos por vacío con el retenedor

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional con el número de serie 61/484,701 presentada el 11 de mayo de 2011, la divulgación de la cual se incorpora por la presente como referencia.

Campo de la invención

Las realizaciones divulgadas en la presente se refieren a un retenedor de membrana de transferencia para realizar inmunoensayos y a un uso del retenedor de membrana de transferencia en un dispositivo para realizar inmunoensayos, y a un método para realizar inmunoensayos asistidos por vacío en una o más membranas. Más en particular, se refiere a una técnica para aplicar reactivos, soluciones de lavado y químicas de detección a una membrana de transferencia para lograr esta detección rápidamente mediante el uso de vacío o presión positiva.

Antecedentes

El uso de electroforesis en gel es actualmente la técnica ubicua para la separación de materiales biológicos. Los materiales no biológicos también se pueden separar usando geles u otros soportes cromatográficos, pero el alcance del esfuerzo con respecto a los productos biológicos es mayor. Las aplicaciones habituales incluyen la separación de fragmentos de ácido nucleico de varios tamaños, ya sea en el contexto de la determinación de secuencia; en la detección de polimorfismos; o la verificación de tamaños en otros contextos. También se realizan frecuentemente separaciones de proteínas, glicoproteínas, fragmentos de proteína y la aplicación de separaciones en gel como verificación de homogeneidad o pureza, identificación de modificaciones postraduccionales y confirmación del peso molecular.

En todos estos procedimientos, se aplican muestras mixtas de entidades biológicas a geles electroforéticos y los componentes se separan por la aplicación de un campo eléctrico a través del gel. Independientemente de la manera en que se desarrolle el gel, el patrón de migración resultante de las sustancias contenidas en la muestra se debe detectar de alguna manera.

Para realizar esta detección, habitualmente el soporte de gel se pone en contacto con una membrana de transferencia a la que se transfieren las sustancias en el mismo patrón en el que aparecieron en el gel. Las "manchas" se detectan entonces, como mínimo, al bloquear la membrana con una solución de proteína o detergente para reducir la unión no específica (que de otra manera conduce a un alto nivel de ruido y bajo nivel de detección). Los agentes de bloqueo habituales incluyen caseína, albúmina de suero bovino (BSA), leche en polvo sin grasa (en general aproximadamente 1-5%) en una solución salina de agente amortiguador de Tris con agente tensioactivo de TWEEN^{MR} (solución de TBS-T) o solución salina de agente amortiguador de fosfato con agente tensioactivo de TWEEN^{MR} (solución de PBS-T). Entonces, la entidad biológica se incuba con un anticuerpo específico para el antígeno en la membrana. Entonces, la membrana se lava extensamente para remover cualquier contaminante, proteínas de bloqueo no unidas o anticuerpos y similares. Entonces, la membrana se trata y se incuba con un anticuerpo secundario conjugado con enzima, radioisótopo, fluorfluor, o biotina específico para el anticuerpo primario. Entonces, la membrana se lava extensamente de nuevo para remover cualquier anticuerpo secundario no unido. Entonces, se aplica un reactivo de detección, en general un material cromogénico, quimioluminiscente, fluorescente, radiológico, o marcado con estreptavidina, que se une a, o es un sustrato del conjugado de enzima. Por último, se utiliza el dispositivo de detección apropiado para determinar la presencia, ausencia, posición, cantidad, etc. de la entidad biológica. Los últimos seis pasos en general toman de 3-6 horas a toda la noche dependiendo de la velocidad de la reacción entre los reactivos seleccionados, la membrana y la entidad biológica. El proceso requiere múltiples períodos de incubación de la membrana en una plataforma de balanceo u otra plataforma de mezcla adecuada. Es un proceso largo que a la mayoría de los investigadores no les gusta y que consume (desperdicia) un gran volumen de reactivos.

Algunos investigadores han sugerido el uso de la acción capilar de un material absorbente tal como el papel de filtro colocado por debajo de la membrana para extraer los fluidos restantes a través de la membrana y mejorar la velocidad del proceso, especialmente los pasos de lavado.

US 5,155,049 menciona un sistema llamado cámara de hibridación Hybrid-Ease^{MR} comercializado por Hoefer Scientific Instruments. Esta cámara se compone de dos rejillas entre las que se intercala la membrana. Las placas de rejilla se ajustan a presión en su posición que circunda a la membrana, y las jeringas se ajustan en el espacio abierto creado por las rejillas. Una jeringa se utiliza para aplicar reactivos y lavar, y la otra para retirar el exceso. El sistema requiere grandes volúmenes de líquido a fin de operar, es complicado de emplear y aún consume bastante tiempo. También menciona que en algunos ensayos particulares, tal como ensayos ELISA, en pocillos de pequeño volumen (tal como placa de microtítulo de 96 pocillos), otros han usado vacío para extraer líquidos a través de una membrana en un paso de lavado. Sin embargo, descuentan este esfuerzo, puesto que sólo está disponible en aplicaciones de pequeño volumen y aún es incontrolable. En su lugar, sugieren que el mejor método

es usar una prensa manual que tenga la membrana encima de un papel de filtro y una capa de cubierta y entonces prensar la intercalación de membrana entre dos placas para exprimir el líquido a través de la membrana y dentro del papel.

En USSN 60/732,994, presentada el 3 de noviembre de 2005, se sugiere que se use un dispositivo formado por varias capas que incluya una capa de soporte porosa por debajo de la una o más capas de membrana de transferencia, un distribuidor de flujo por encima de las membranas de transferencia y un pocillo en el distribuidor de flujo para contener el líquido en el área deseada y permitir volúmenes iniciales más bajos de este líquido. Preferentemente, el distribuidor de flujo es una membrana porosa no de unión o de baja unión.

En las solicitudes de Estados Unidos de América, pendientes de resolución, números de serie 11/582,727, presentada el 18 de octubre de 2006, y 11/582,599, publicada como US 2007/098601 A1, se divulga un dispositivo en el que un retenedor que tiene un director de flujo y un soporte poroso se podría ajustar en un aparato de colector para procesar los diversos fluidos y detectar la entidad biológica. El colector tiene una cubierta con o sin un pocillo y una abertura central en línea con una abertura central del retenedor. En tanto que es útil, tiene limitaciones que inhiben su uso y aceptación universal.

Está claro que se requiere un método más eficiente para la detección de los materiales o entidades biológicas en membranas de transferencia. Las realizaciones divulgadas en la presente permiten una detección más efectiva y eficiente de entidades biológicas en una membrana de transferencia.

Sumario

La presente invención se expone en las reivindicaciones 1, 2, 10 y 12, respectivamente. Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones anexas. La invención se refiere a un retenedor de membrana de transferencia para realizar inmunoensayos, un dispositivo para realizar inmunoensayos, un método para operar este dispositivo y un método para realizar inmunoensayos asistidos por vacío en una o más membranas.

De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un retenedor de membrana de transferencia para realizar inmunoensayos. El retenedor de membrana de transferencia comprende un bastidor, y una malla de polipropileno no tejida. El bastidor tiene un borde perimetral y se configura para soportar una membrana de transferencia, y un distribuidor de flujo se une al bastidor. Se lamina una hoja de papel a un lado de esta malla de polipropileno, en donde la malla de polipropileno se une al bastidor a lo largo de un borde. Cuando el retenedor de membrana de transferencia está cerrado, se va a intercalar una membrana de transferencia entre la malla de polipropileno no tejida y el distribuidor de flujo.

El retenedor de membrana de transferencia se puede utilizar en un aparato útil para llevar a cabo el método divulgado en la presente. El dispositivo se compone de un retenedor de membrana de transferencia (también conocido como un retenedor de transferencia, o simplemente como un retenedor) formado por una capa de soporte poroso inferior y un distribuidor de flujo superior. Los dos se mantienen unidos por un método tal como por una bisagra, pinzas, bandas elásticas, adhesivos, bola y agujero, pasadores y rebajes, o sujetadores de acoplamiento de manera cooperativo u otro medio similar. Se abre el retenedor y se colocan una o más membranas de transferencia entre las capas inferior y superior. Entonces se cierra el retenedor y se coloca en un portador formado por una placa superior e inferior, cada una con al menos una abertura que permite que el fluido pase a través de la placa superior del portador, a través del retenedor y las membranas contenidas dentro de este, y entonces a través de la placa inferior del portador. Entonces, el portador se coloca en el aparato de colector para procesar las muestras en la membrana de transferencia. Después de la finalización del proceso, el portador se remueve del colector, se abre, y se remueve el retenedor de membrana de transferencia. El retenedor de membrana de transferencia se abre y la membrana de transferencia se extrae para la detección corriente abajo.

En otra realización, el retenedor se forma de un material seleccionado del grupo que consta de plástico y papel, el retenedor tiene una porción superior y una porción inferior, cada porción superior e inferior tiene un borde externo, una superficie superior y una superficie inferior y un espesor entre las superficies superior e inferior, al menos una de las porciones tiene una porción sólida hacia dentro del borde externo, al menos la porción superior tiene una abertura hacia dentro del borde externo, un soporte poroso formado en la superficie superior de la porción inferior y un distribuidor de flujo formado en una superficie inferior de la porción superior, cuyo distribuidor cubre la abertura de la porción superior, en donde el retenedor tiene un medio para asegurar de manera liberable la primera y segunda porciones entre sí cuando las porciones superior e inferior del retenedor se alinean tal que la superficie inferior de la porción superior y la superficie superior de la porción inferior se alinean y se arreglan adyacentes entre sí para juntar la porciones superior e inferior.

En otra realización, el retenedor se forma tal que cada una de las porciones superior e inferior tenga una perforación a lo largo de un lado y la perforación se alinee en las porciones superior e inferior, y las perforaciones se rasguen fácilmente para abrir el retenedor para recuperar la membrana de transferencia.

En una realización, el portador tiene una pared de perímetro externa que se extiende hacia arriba desde la abertura

de la placa superior del portador para formar un pocillo para retener reactivos y fluidos de lavado.

En una realización adicional, un portador tiene uno o más indicadores de nivel para indicar si la superficie superior del portador se nivela en el plano horizontal a lo largo de al menos su longitud y preferentemente a lo largo de su longitud y ancho. El nivel también podría estar en el colector

En otra realización, el indicador de nivel es un indicador de burbuja de 360 grados individual.

En una realización adicional, los indicadores de nivel son al menos dos indicadores de burbuja de nivel de línea con al menos uno arreglado a lo largo de la longitud de la superficie superior de la placa superior y al menos uno arreglado a lo largo del ancho de la superficie superior de la placa superior.

En una realización adicional, las superficies internas del portador contienen una característica para estirar la una o más membranas de transferencia en el retenedor para evitar la formación de arrugas en la membrana y hacer que la superficie de la membrana sea lo más plana posible.

En otra realización, el portador tiene una característica de estiramiento formada por un sello de brida ubicado en al menos una de las superficies internas de las placas superior o inferior. Preferentemente, tiene un sello de brida formado en al menos las superficies internas adyacentes de la placa inferior. Más preferentemente, los sellos de brida se ubican en un ancho y longitud que es mayor que la abertura del retenedor pero menor que el ancho y la longitud del borde externo del retenedor.

En otra realización, el portador tiene una característica de estiramiento que consta de un miembro comprimible o flexible colocado en una mitad del portador con una característica rígida elevada opuesta en la otra mitad del portador.

En una realización, el colector se subdivide en dos o más subpocillos para correr membranas de transferencia paralelas o subpartes de una membrana de transferencia, cada membrana se procesa habitualmente con al menos un reactivo diferente.

En otra realización, el portador se subdivide en dos o más subpocillos con el retenedor también subdividido en subpocillos correspondientes.

En otra realización, los subpocillos de portador se sellan individualmente y se alinean con los subpocillos de retenedor que corresponden a fin de impedir la migración de fluido entre pocillos.

En otra realización, el colector tiene pies de nivelación que cuando se usan en conjunto con uno o más indicadores de nivel de una realización del portador permiten que el colector y el portador se nivelen en un plano horizontal.

En una realización, el colector tiene una serie de pies que se pueden ajustar en una dirección vertical a fin de nivelar el colector con relación a los indicadores de nivel en el portador cuando el portador se une al colector.

En una realización adicional, la serie de pies tiene un tornillo que se ajusta en una porción roscada de la parte inferior de colector para permitir que los pies se eleven o desciendan individualmente en una dirección vertical.

En otra realización, el colector se subdivide en dos o más subpocillos para correr portadores paralelos con diferentes membranas de transferencia o subpartes de una membrana de transferencia, cada membrana se procesa habitualmente con al menos un reactivo diferente.

En otra realización, la abertura de placa superior de portador tiene una tapa colocada sobre el borde superior de la abertura para minimizar la evaporación durante un largo plazo, es decir, durante la incubación durante la noche.

En otra realización, la tapa tiene una relación resellable con el pocillo.

En otra realización, la tapa es un bloqueo de luz tal como estar hecha de un material opaco.

En otra realización, la abertura en la placa inferior de portador tiene una cubierta para impedir fugas de fluido.

En otra realización, la cubierta se sella de manera liberable.

En otra realización, la cubierta tiene una característica de válvula.

En otra realización, la válvula es de una configuración de pico de pato o paraguas.

En otra realización, la válvula es operativa por un diferencial de presión y se cierra cuando no hay diferencial de presión presente a través de la válvula.

En otra realización, se proporciona un método rápido, eficiente y conveniente para detectar una o más entidades biológicas en una membrana de transferencia. La detección puede estar con relación a la posición, naturaleza o cantidad de la sustancia biológica en una membrana. El método implica un regimiento asistido por presión, seleccionado de presión positiva o un vacío para el suministro y remoción de reactivos hacia y desde la membrana de transferencia y permite el lavado de los contaminantes de sustancias incrustadas en la membrana que se van a detectar usando volúmenes muy bajos de líquido y reactivos. Este método permite completar los pasos de bloqueo, lavado y unión a anticuerpos en aproximadamente 30-45 minutos sin comprometer la calidad de transferencia. Uno simplemente toma un retenedor, lo abre y coloca las membranas de transferencia en una de las superficies tal que la superficie inferior de la membrana de transferencia esté adyacente al soporte poroso y la superficie superior de la membrana de transferencia esté adyacente al distribuidor de flujo cuando el dispositivo se cierra alrededor de las membranas. El dispositivo se coloca sobre o en un colector que tiene un suministro de presión o vacío y se inicia el proceso.

Es otro objeto de las realizaciones divulgadas en la presente proporcionar un aparato para realizar inmunoensayos asistidos por presión o vacío de una o más transferencias que comprende un colector de vacío, un portador diseñado para ajustarse en el colector y un retenedor diseñado para ajustarse dentro del portador para procesar las transferencias y un medio para recolectar uno o más de los anticuerpos.

Un objeto adicional de las realizaciones divulgadas en la presente es proporcionar un proceso para realizar inmunoensayos asistidos por vacío en una o más membranas que comprende los pasos de:

a. proporcionar un colector de vacío, un portador para retener un retenedor, el portador que se forma por una placa superior y una placa inferior, cada una con al menos una abertura formada a través de su espesor para permitir que el fluido fluya a través de la misma, un retenedor para la una o más membranas de transferencia, el retenedor que es capaz de colocarse entre las placas superior e inferior del portador y está en comunicación para fluidos con la al menos una abertura de cada placa del portador, el retenedor que se forma de un soporte poroso y un distribuidor de flujo que se retienen juntos, una o más membranas que contienen una o más entidades biológicas que se van a evaluar, las membranas que se colocan en el soporte poroso, un distribuidor de flujo que está en la parte superior de la membrana y el retenedor que se coloca entre las placas superior e inferior del portador tal que el distribuidor de flujo esté adyacente a la superficie inferior o interna de la placa superior y el soporte poroso está adyacente a la superficie interna o superior de la placa inferior,

b. adicionar uno o más reactivos a la al menos una abertura de la placa superior de portador y aplicar un vacío para tirar de los reactivos hacia la membrana a través de la abertura en la placa superior, el distribuidor de flujo y el soporte poroso del retenedor y la abertura de la placa inferior, y

c. adicionar uno o más agentes de lavado al uno o más pocillos y aplicar un vacío para extraer los agentes de lavado y cualquier reactivo no unido a través de la abertura de placa superior, el distribuidor de flujo, la membrana y el soporte poroso y la abertura de la placa inferior del portador y hacia el colector de vacío y

d. repetir los pasos (b y c) una o más veces adicionales según se desee o se requiera.

En ciertas realizaciones, se divulga un dispositivo para realizar inmunoensayos que comprende un retenedor formado de un material seleccionado del grupo que consta de plástico y papel, el retenedor que tiene una porción superior y una porción inferior, cada porción superior e inferior que tiene un borde externo, una superficie superior y una superficie inferior y un espesor entre las superficies superior e inferior, al menos una de las porciones tiene una porción sólida hacia dentro del borde externo, al menos la porción superior tiene una abertura hacia dentro del borde externo, un soporte poroso formado en la superficie superior de la porción inferior y un distribuidor de flujo formado en una superficie inferior de la porción superior, cuyo distribuidor cubre la abertura de la porción superior, en donde el retenedor tiene un medio para asegurar de manera liberable la primera y segunda porciones entre sí cuando las porciones superior e inferior del retenedor se alinean tal que la superficie inferior de la porción superior y la superficie superior de la porción inferior se alineen y arreglen adyacentes entre sí para juntar las porciones superior e inferior.

En ciertas realizaciones, el medio para asegurar de manera liberable puede comprender un material de sellado formado hacia fuera y que circunscribe la abertura de soporte poroso. La porción superior e inferior del retenedor se puede hacer de una pieza de material y el retenedor puede tener un pliegue que corre un ancho del retenedor para formar una primera porción y una segunda porción. El pliegue puede ser una bisagra.

En ciertas realizaciones, el distribuidor de flujo puede tener una superficie inferior y una superficie superior y la superficie superior del distribuidor de flujo se puede unir a la superficie inferior de la porción superior del retenedor tal que el espesor de la primera porción forme uno o más pocillos en la superficie superior del distribuidor de flujo. La abertura de la porción superior se ubica centralmente dentro del borde externo de la porción superior.

En ciertas realizaciones, el dispositivo para realizar inmunoensayos puede comprender un retenedor y un portador

para el retenedor, el retenedor que se forma de un material seleccionado del grupo que consta de plástico y papel, el retenedor puede tener una porción superior y una porción inferior, cada porción superior e inferior puede tener un borde externo, una superficie superior y una superficie inferior y un espesor entre las superficies superior e inferior, al menos una de las porciones puede tener un porción sólida hacia dentro del borde externo, al menos la porción superior puede tener una abertura hacia dentro del borde externo, un soporte poroso formado en la superficie superior de la porción inferior y un distribuidor de flujo formado en una superficie inferior de la porción superior, cuyo distribuidor cubre la abertura de la porción superior, en donde el retenedor puede tener un medio para asegurar de manera liberable la primera y segunda porciones entre sí cuando las porciones superior e inferior del retenedor se alinean tal que la superficie inferior del la porción superior y la superficie superior de la porción inferior se alineen y arreglen adyacentes entre sí para juntar las porciones superior e inferior.

En ciertas realizaciones, el dispositivo también puede comprender un portador para el retenedor compuesto por una placa superior y una placa inferior, cada una con un ancho y una longitud, una superficie superior e inferior y un espesor entre las superficies superior e inferior, un borde externo y al menos una abertura, las placas tienen una longitud y un ancho mayores que la longitud y el ancho del retenedor, la placa superior del portador tiene un abertura sustancialmente igual en ancho y longitud a la abertura de la porción superior del retenedor, la superficie inferior de la placa superior y la superficie superior de la placa inferior, cada una con uno o más sellos alineados entre sí cuando las dos placas están adyacentes entre sí y los sellos están arreglados en cada superficie en un ancho y longitud mayor que el de la abertura de la placa superior, pero menor que las dimensiones exteriores del retenedor, al menos una de las placas tiene un sello formado adyacente al borde externo de la placa y hacia afuera del sello de esa placa, y un medio para retener de manera liberable la placa superior e inferior conjuntamente.

En ciertas realizaciones, los sellos en la superficie inferior de la placa superior y la superficie superior de la placa inferior pueden ser sellos de brida.

En ciertas realizaciones, puede haber al menos un dispositivo indicador de nivel unido a la superficie superior de la placa superior, y puede incluir un indicador de 360 grados. Puede haber dos indicadores de nivel, uno a lo largo de la longitud y el otro a lo largo del ancho de la superficie superior de la placa superior.

En ciertas realizaciones, se divulga un dispositivo para realizar inmunoensayos asistidos por vacío que comprende un colector de vacío y un retenedor formado de plástico o papel, el retenedor tiene un pliegue que corre un ancho del retenedor para formar una primera porción y segunda porción, cada porción tiene una abertura que se alinea cuando el retenedor se pliega cerrado a lo largo del pliegue, un soporte poroso cubre una primera abertura y un distribuidor de flujo cubre la segunda abertura en donde el retenedor tiene un medio para asegurar de manera liberable la primera y segunda porciones entre sí cuando el retenedor se pliega cerrado a lo largo del pliegue para juntar la primera y segunda porciones. El distribuidor de flujo puede ser una membrana.

En ciertas realizaciones, se divulga un dispositivo para realizar inmunoensayos que comprende un colector de vacío que tiene una base, la base que tiene una superficie de soporte superior para soportar uno o más portadores que contienen un retenedor que se va a procesar y un drenaje por debajo del soporte, la superficie superior que contiene una o más aberturas centrales que se extienden a través de ella y la una o más aberturas centrales están en alineación con el uno o más portadores.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una vista en separación de las partes de un portador de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 2 es una vista en perspectiva de un portador en una posición abierta de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 3 es una vista en perspectiva de un portador en una posición cerrada de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 4 es una vista en perspectiva, mostrada en sección transversal, de un portador de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 4A es una vista en perspectiva, mostrada en sección transversal, de un portador de acuerdo una válvula de paraguas de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 5 es una vista en perspectiva de un retenedor de membrana de transferencia, que incluye una membrana de transferencia, de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 5A es una vista en perspectiva de un retenedor de membrana de transferencia, que muestra un distribuidor de flujo, de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 5B es una vista en perspectiva, vista desde el lado inferior, de un retenedor de membrana de transferencia, de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 6 es una vista en perspectiva de un portador en una posición abierta, que incluye el retenedor de la figura 5, de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 7 es una vista en perspectiva en separación de las partes del lado inferior del portador de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 8 es una vista en perspectiva del lado inferior del portador con la cubierta en su lugar, de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 9 es una vista en perspectiva de un colector de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 9A es una vista en perspectiva de un colector con un recipiente de recolección de acuerdo con ciertas realizaciones;

La figura 10 es una vista en perspectiva en separación de las partes de un colector, que incluye portadores, de acuerdo con ciertas realizaciones; y

La figura 10A es una vista en perspectiva de un colector, retenedor y portador de acuerdo con ciertas realizaciones.

Descripción detallada

Volviendo en primer lugar a la figura 1, se muestra un portador 10 de acuerdo con ciertas realizaciones. En la realización mostrada, el portador 10 incluye una tapa 11, una placa superior de portador 12, una placa inferior de portador 13, una cubierta 14, y un nivel de burbuja 15 en la placa superior de portador 12. De acuerdo con ciertas realizaciones, el portador 10 sirve para retener el retenedor de transferencia plano y para distribuir reactivos tal como anticuerpos, agente amortiguador de lavado, etc. al retenedor de transferencia. De acuerdo con ciertas realizaciones, el portador 10 es un dispositivo independiente, separado de una base de colector (analizada a continuación), que permite que el usuario configure múltiples transferencias al mismo tiempo. Por lo tanto, cada portador 10 se puede cargar selectivamente con retenedores de transferencia que contienen transferencias, sus respectivos anticuerpos adicionados, y entonces incubarse.

La figura 2 muestra una realización del portador 10 en una posición abierta, con el lado inferior de la placa superior 12 mostrado a la izquierda en la figura y el lado superior de la placa inferior 13 mostrado a la derecha. En la realización mostrada, la placa superior 12 y la placa inferior 13 se conectan de manera abisagrada en 16. Como se muestra en esta realización, la bisagra es una bisagra "viva" que une las dos partes entre sí. De manera alternativa, la bisagra se podría hacer por separado y unirse usando adhesivos, uniones térmicas o sujetadores mecánicos. Otras realizaciones no usan bisagra (no se muestra) y usan pinzas, bandas elásticas o sujetadores de acoplamiento cooperativo tal como una ranura y retén, pasador de ajuste por fricción o similar formado sobre o en las respectivas porciones superior e inferior para mantenerlos juntos durante el uso. Otro medio comparable será obvio para un experto en la técnica y se propone incluirlo también.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la placa superior de portador 12 puede ya sea tener uno o más pocillos 22, que se pueden utilizar para retener y/o distribuir fluidos de lavado y reactivos durante el uso. Los pocillos 22 pueden ya sea formarse como parte de la superficie superior de la placa superior de portador 12 con paredes verticales 22a, 22b, 22c y 22d (figura 1), o como una pieza separada que simplemente se une o se coloca en la parte superior de la placa superior de portador 12. La tapa 11 se puede colocar en el portador 10 para cubrir el pocillo 22 e impedir que los anticuerpos y otros fluidos se evaporen durante períodos de incubación extendidos, particularmente durante la incubación durante la noche.

La placa inferior de portador 13 incluye un soporte poroso 4 que puede ser un tamiz simple, una rejilla, una rejilla de dirección de flujo o una estructura porosa sinterizada tal como una membrana POREX^{MR} o un filtro microporoso de poro grueso o grande, tal como un papel tejido o no tejido, una tela de polipropileno o polietileno, una estera de vidrio o papel, o un filtro microporoso de 1-10 micrones. Estos soportes se pueden hacer de materiales de polímero, vidrio, cerámica o metal incluyendo pero no limitado a metales, tal como acero inoxidable o aleación de acero, aluminio y similares, y polímeros tal como polietileno, polipropileno, polisulfona, polietersulfonas, estirenos, nylons y similares. La figura 2 muestra un soporte poroso 4 en la forma de una rejilla de dirección de flujo que incluye una serie de surcos 72 y aberturas 74. Las aberturas 74 se colocan hacia dentro desde el perímetro del soporte poroso 4. Las aberturas 74 están en comunicación para fluidos con los surcos 72 tal que el fluido se recolecte en los surcos 72 y se dirija a través de las aberturas 74. Los surcos 72 recolectan y distribuyen el fluido gastado a las aberturas 74 que dirigen el fluido a una cámara de residuos o bandeja de recolección (no mostrada). Si el investigador desea recolectar uno o más de los fluidos, entonces se puede colocar adecuadamente una bandeja de recolección para hacerlo. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar otros patrones de surcos o aberturas, puesto que el resultado deseado es dirigir los fluidos gastados a una abertura o una serie de aberturas que dirigen los fluidos gastados a un destino predeterminado.

Los bordes externos del soporte 4 y la placa superior de portador 12 se pueden hacer de los mismos materiales

que el soporte 4. Cuando se utiliza una bisagra integral, debe estar hecha de un material flexible tal como polietileno, polipropileno, un elastómero o uno de los materiales modificados por impacto tal como ABS, resina K y similares. Cuando se utiliza una bisagra separada, pinzas, bandas elásticas, película adhesiva u otro medio de fijación, se pueden hacer de metal, plástico o elastómeros, según se desee.

De acuerdo con ciertas realizaciones, un primer sello de brida 30A se coloca en el lado inferior de la placa superior de portador 12 como se muestra, y cooperativamente con un segundo sello de brida 30B colocado alrededor del soporte poroso 4 en la placa inferior de portador 13, mantiene un sistema hermético a fluidos cuando las placas superior e inferior están en la posición cerrada con el retenedor de transferencia acoplado. Por lo tanto, los sellos de brida 30A y 30B se colocan tal que cuando la placa superior de portador 12 se gire con respecto a la placa inferior de portador 13 a una posición cerrada, los dos sellos se registran o alinean entre sí para sellar el portador. En ciertas realizaciones, cada sello de brida 30A, 30B se hace preferentemente de un elastómero flexible tal como silicona, o elastómero termoplástico (TPE) y tiene forma de V, con una pata de la V que es más corta que la otra. El extremo largo de cada sello de brida en forma de V se asienta en un respectivo rebaje de las placas superior e inferior de portador (figura 4). La pata corta de cada sello en forma de V es una característica elevada y fácilmente deformable. En la posición cerrada y sellada de portador, las patas más cortas de la V en la placa superior de portador se pondrán en contacto con la superficie superior del retenedor de transferencia. La pata más corta de la V en la placa inferior de portador se pondrá en contacto con la parte inferior del retenedor de transferencia y se desviará como se ve mejor en la figura 4. La geometría en ángulo del sello ejerce una fuerza para tirar o estirar el retenedor 50 cuando se desvía, lo que "tamborilea" la membrana y la mantiene plana. Una membrana plana evita deformidades que pueden crear picos y valles en la superficie de membrana que agrupa el volumen de anticuerpo, que a su vez conduce a áreas de la membrana de transferencia que tienen más o menos exposición a los anticuerpos, dando por resultado resultados deficientes e inconsistentes. Este sello impide fugas y permite la incubación a largo plazo (por ejemplo, durante la noche). El diseño del sello también permite un mecanismo de sellado de baja fuerza y baja fuerza de sujeción requerida para el portador 10. Esto ayuda a mantener la planicidad del retenedor y la membrana de transferencia. Un pestillo liberable 35 u otro mecanismo de bloqueo bloquea el portador en la posición cerrada (figura 3). De acuerdo con ciertas realizaciones, se puede utilizar un sello de brida individual, preferentemente el sello de brida 30B para la placa inferior. El sello de brida inferior 30B funciona para estirar el retenedor de transferencia. Una vez estirada, la interfaz se diseña tal que la parte superior e inferior de portador pellizquen el retenedor de transferencia en su lugar. Los sellos de brida externa 300A, 300B también se muestran en la figura 4.

Las figuras 5, 5A y 5B muestran un retenedor 2 de acuerdo con ciertas realizaciones. El retenedor 2 incluye un bastidor 40 que tiene un borde de perímetro configurado para soportar una membrana de transferencia de proteínas 45. En ciertas realizaciones, el bastidor 40 se construye de plástico o papel. En ciertas realizaciones, el material del bastidor 40 puede ser biorresina, cartón, HIPS, papel, o cualquier otro material rígido adecuado que pueda soportar la membrana y mantenerla plana. De acuerdo con ciertas realizaciones, un distribuidor de flujo 46, tal como una membrana de GVPP, se lamina o se une de otra manera al bastidor, y sobre el cual se puede colocar la membrana de transferencia 45. El distribuidor de flujo 46 se une al bastidor y la membrana de transferencia se intercala entre el distribuidor de flujo 46 y el soporte poroso 47 cuando el retenedor de transferencia se cierra. El soporte poroso 47 en el retenedor de transferencia se soporta y está en contacto con el soporte poroso 4 de la placa inferior de portador. El distribuidor de flujo 46 funciona para distribuir uniformemente la solución de bloqueo y los anticuerpos sobre la membrana de transferencia. También regula el flujo a través de estas soluciones cuando se aplica el vacío. El retenedor 2 también incluye un soporte poroso 47, una malla no tejida de polipropileno unida al bastidor a lo largo de un borde, lo que permite un fácil acceso para que el usuario adicione la membrana de transferencia, y que soporta la membrana de transferencia y la protege del daño bajo la fuerza de vacío. El soporte 47 es poroso para permitir el flujo libre de líquidos a través del retenedor de transferencia 2. El retenedor 2 se muestra correctamente colocado en el portador 10 en la figura 6.

En ciertas realizaciones, el retenedor 2 se puede hacer al laminar un adhesivo sensible a la presión a la parte posterior de una malla de polipropileno tal que después de adicionar la membrana de transferencia al retenedor, el usuario remueve una tira de respaldo para exponer el adhesivo sensible a la presión y entonces sella la malla al distribuidor de flujo (por ejemplo, a la membrana de GVPP) para crear una envoltura sellada. Para remover la membrana de transferencia, se pueden incluir perforaciones y cremalleras para rasgar la envoltura.

En ciertas realizaciones, un papel patapar delgado, papel encerado u otra hoja delgada de material de papel se lamina a un lado de una malla de polipropileno. Cuando el retenedor se moja con agua (como se requiere en el proceso), el retenedor de papel húmedo se adhiere a la membrana de GVPP, creando un sello temporal. Después de que se completa el proceso, la membrana de transferencia es fácil de remover sin tener que rasgar nada ni manejar adhesivos pegajosos. Entonces se desecha el retenedor, puesto que después de que el respaldo de papel se seque, se riza y el retenedor se vuelve inutilizable.

Las figuras 7 y 8 ilustran el lado inferior de la placa inferior de portador 13. Visible en la figura 7 son la pluralidad de aberturas 74 en el soporte poroso 4. La cubierta 14 se utiliza para cubrir las aberturas para impedir la fuga de anticuerpos durante la incubación, particularmente cuando se incuba durante largos períodos de tiempo, tal como durante la noche, como se ve en la figura 8. De acuerdo con ciertas realizaciones, las aberturas 74 se circundan

por un anillo elevado anular 49, y la cubierta 14 tiene una ranura anular 60 correspondiente (figura 4) configurada para acoplarse con el anillo anular 49 y, por lo tanto, la cubierta se puede prensar sobre el anillo para asegurarlo a la placa de portador 13.

Alternativamente, la cubierta 14 se puede eliminar, y se puede utilizar una válvula de paraguas 144 para retener el líquido durante la incubación, como se muestra en la figura 4A. Cuando se enciende el vacío, la válvula se abre y el líquido drena. Preferentemente, la válvula está hecha de EPDM (monómero de etileno propileno dieno) debido a su rigidez y capacidad de cerrarse rápidamente cuando se apaga el vacío. Esto ayuda a impedir la contrapresión y la captura de aire, que (con las válvulas de silicona) estaba provocando que el retenedor de transferencia se arqueara y condujera a una agrupación adversa de anticuerpos. La agrupación de anticuerpos (cobertura no uniforme) conduce a una señal no uniforme en la lectura de transferencia final, las áreas cercanas al aire atrapado tendrán una señal débil (leve) y las áreas con anticuerpos agrupados tendrán una señal fuerte (negritas).

Como se muestra en las figuras 9 y 10, de acuerdo con ciertas realizaciones, el colector 8 es un colector de vacío que se puede unir a una fuente de vacío adecuada (no mostrada). El colector 8 puede incluir un dispositivo de recolección de desechos (no mostrado), tal como un receptáculo, colocado en el colector (no mostrado) para recolectar el líquido extraído a través del portador 10.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el colector 8 tiene una base 42, que tiene una superficie de drenaje y soporte 44 en la que se colocan uno o más portadores 10. La superficie de soporte 44 incluye uno o más pocillos o regiones de recepción de portador 55A, 55B (dos mostrados en la figura 9) que puede incluir una pluralidad de nervaduras verticales 56 que reciben el lado inferior de la placa inferior de portador 13 para retener el portador 10 de una manera estable en el colector 8. También se muestran respectivos controles opcionales 62 para gestionar y monitorear el colector 8 y el proceso. El dispositivo se puede utilizar con manipuladores de líquidos automatizados y similares si se desea. Cuando el colector 8 se subdivide en uno o más pocillos o regiones de recepción de portador, el colector puede procesar más de un portador para correr portadores paralelos con diferentes membranas de transferencia o subpartes de una membrana de transferencia, cada membrana se procesa habitualmente con al menos un reactivo diferente. El colector 8 puede tener una fuente de presión común o cada región de recepción de portador de estación se puede controlar por presión individualmente.

En otra realización, el colector tiene pies de nivelación que cuando se usan en conjunto con uno o más indicadores de nivel de una realización del portador permiten que el colector y el portador se nivelen en un plano horizontal. En una realización, el colector tiene una serie de pies que se pueden ajustar en una dirección vertical a fin de nivelar el colector con relación a los indicadores de nivel en el portador cuando el portador se une al colector. En una realización adicional, la serie de pies tiene un tornillo que se ajusta en una porción roscada de la parte inferior de colector para permitir que los pies se eleven o desciendan individualmente en una dirección vertical.

Se pueden utilizar varios métodos en las realizaciones divulgadas en la presente. El factor clave es que todos dependen de una filtración impulsada por vacío o presión positiva de los líquidos para acceder a la gran área de superficie interna de la membrana que permite la interacción 3-D de todas las moléculas de principio a fin de la profundidad en lugar de sólo la interacción 2-D en la superficie como se ha presentado en el pasado. Cuando se utiliza presión positiva, la base podría ser una cámara cerrada que podría contener el portador, y la tapa 11 se convertiría en un colector de presión para aplicar presión al pocillo 22 del portador.

El método más simple es utilizar las realizaciones divulgadas en la presente para llevar a cabo uno o más de los ciclos de lavado. Habitualmente, cada ciclo de lavado se compone de uno o más pasos de lavado. En general, se utilizan de 2 a 5 pasos por ciclo.

Otro método es utilizar las realizaciones divulgadas en la presente en cada paso en la que el líquido necesita moverse a través de la membrana de transferencia tal como después de la incubación de los anticuerpos o en los pasos de lavado.

En todos estos procesos, se puede utilizar cualquier fuerza motriz adecuada para mover los líquidos a través del dispositivo y hacia el colector. Esto puede variar dependiendo de las membranas seleccionadas para la transferencia y el colector utilizado, la velocidad deseada de la filtración y el suministro de vacío o presión positiva disponible para el investigador.

En general, el vacío disponible puede variar entre 100 y 760 mm Hg (133 milibares y 1013 milibares). El uso de válvulas, limitadores de presión y similares también se puede utilizar para mantener el vacío dentro de los intervalos permitidos para las membranas utilizadas. Un colector de vacío preferido de una realización utiliza un vacío de aproximadamente 100 mm Hg. Otros colectores de vacío adecuados incluyen pero no se limitan a los colectores de vacío MULTISCREEN^{MR}y MULTISCREEN^{MR}HTS disponibles de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts.

En general, la presión positiva es suministrada por una línea de aire a presiones que varían de aproximadamente 0,14 Bar (2 psi) a aproximadamente 1,03 Bar (15 psi). El uso de válvulas, limitadores de presión y similares también

se puede utilizar para mantener la presión dentro de los intervalos permitidos para las membranas utilizadas. Estos sistemas de presión incluyen pero no se limitan a dispositivos de celda agitada Amicon[MR] disponibles de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts y unidades de filtración de presión positiva disponibles de Caliper Life Sciences de Hopkinton, Massachusetts.

Para usar un dispositivo de acuerdo con las realizaciones divulgadas en la presente, simplemente se toma un retenedor, se abre y coloca las membranas de transferencia en una de las superficies tal que la superficie inferior de la membrana de transferencia esté adyacente al soporte poroso y la superficie superior de la membrana de transferencia esté adyacente al distribuidor de flujo cuando el dispositivo se cierra alrededor de las membranas a fin de que no tenga ninguna burbuja de aire entre la transferencia y el distribuidor de flujo. Las burbujas entre estas dos superficies pueden provocar áreas sin flujo. El retenedor de transferencia se coloca entonces dentro del portador que entonces se cierra de manera segura con el mecanismo de pestillo. El dispositivo se coloca sobre o en un colector que tiene un suministro de presión (vacío o presión positiva). Preferentemente, las membranas de transferencia se han prehumedecido. La presión (vacío o presión positiva) se enciende y un líquido, tal como un líquido de lavado o un reactivo, se coloca en el pocillo de un portador. La presión continúa hasta que el líquido se haya movido a través del dispositivo y las membranas. Entonces se apaga la presión.

Cuando se usa más de una membrana de transferencia, se pueden arreglar en serie una encima de la otra y se puede mover fácilmente suficiente líquido que contiene los mismos reactivos deseados a través de las múltiples capas en un paso de proceso. En general, cuando se usa más de una capa, se prefiere que se use entre 2 y 10 capas, preferentemente entre 2 y 5 capas a la vez.

El líquido ya sea se puede adicionar con el suministro de presión que se apaga o el suministro que se enciende sólo brevemente para obtener el líquido en las membranas y se deja incubar (tal como se puede requerir con los anticuerpos primarios o secundarios). La presión se enciende entonces para remover el líquido y/o reemplazarlo por otro utilizado secuencialmente. Preferentemente, durante los lavados, el vacío se deja encendido y los lavados restantes se adicionan secuencialmente.

Opcionalmente, si se desea, se puede colocar un recipiente de recolección 70 por debajo del dispositivo (figura 9A), preferentemente en el propio colector o corriente abajo, tal como una bandeja de recolección de anticuerpos. Entonces se puede utilizar para recolectar uno o más reactivos no unidos que pueden ser caros y que se pueden recolectar y reciclar para usarse en ensayos futuros. El recipiente también se puede subdividir en múltiples cámaras que están en alineación y comunicación para fluidos con la respectiva porción de la membrana de transferencia.

De manera adicional o alternativamente, se puede colocar en la ruta de flujo corriente abajo por debajo del retenedor una matriz de absorbente que es capaz de unir de manera reversible uno o más reactivos no unidos que son caros. La matriz está preferentemente en la forma de un monolito, tal como una almohadilla, un tapón o una hoja de papel, que se coloca tal que todo el líquido que pase a través de la membrana de transferencia y el retenedor pase a través de la matriz. Entonces se puede ya sea remover y el reactivo se puede eluir o, si se desea, se pueden eluir los reactivos unidos in situ después de la finalización de la prueba de la membrana de transferencia.

También se pueden utilizar otros procesos con el dispositivo de las realizaciones divulgadas en la presente.

La membrana contiene, en sus intersticios, una o más sustancias que se van a detectar. En general, estas sustancias están presentes en los intersticios ya sea en virtud de haberse transferido de un soporte sólido para electroforesis o cromatografía o por aplicación directa, usualmente para detectar la presencia, ausencia, o cantidad de un tipo particular de material tal como un anticuerpo o proteína específica, es decir, un ensayo de tipo de transferencia en mancha como se describe anteriormente. La definición de la membrana no se limita, sin embargo, a estos casos, sino que se aplica a cualquier caso en el que una membrana contiene en sus intersticios una o más sustancias que se van a detectar. En los tipos de membranas previstas para uso en las realizaciones divulgadas en la presente se incluyen las membranas comúnmente utilizadas para transferir geles de electroforesis tal como nitrocelulosa; nylon; o varias otras membranas poliméricas, tal como fluoruro de polivinilideno (PVDF), vendidas como membranas IMMOBILON[MR] por Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts.

Se puede utilizar una variedad de materiales para replicar los resultados de geles de electroforesis realizados en varias muestras como se entiende en la técnica. Más comúnmente, las muestras contienen sustancias biológicas tal como proteínas individuales, anticuerpos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, carbohidratos complejos, y similares, pero la aplicación de la técnica no se limita a estas sustancias. La técnica es aplicable a cualquier membrana que contenga en su interior una sustancia que se va a detectar independientemente de la composición química de la membrana o de las sustancias diana.

Cuando se emplean membranas que representan réplicas de resultados electroforéticos, la transferencia de las sustancias que se van a detectar del gel a la membrana se puede llevar a cabo al utilizar membranas que contienen agente amortiguador de transferencia, por electroelución o por transferencia en seco de los geles. Las técnicas para estas transferencias se entienden bien en la técnica y no constituyen parte de las realizaciones divulgadas en la presente.

El líquido que se va a suministrar puede contener reactivos de detección o simplemente se puede proporcionar como un lavado. La naturaleza del reactivo de detección depende, por supuesto, de la sustancia que se va a detectar. Habitualmente, las proteínas se detectan por reacciones inmunológicas entre el antígeno y el anticuerpo o porciones inmunorreactivas de este; habitualmente la presencia de fragmentos de ácido nucleico se detecta por sondas de oligonucleótidos adecuadas. Las sustancias de detección responsables de la reacción inmediata o específica con la sustancia que se va a detectar se pueden complementar adicionalmente, si es necesario, con etiqueta y puede ser necesaria una multiplicidad de aplicaciones de los reactivos de detección, por ejemplo, un protocolo puede incluir la detección de un antígeno por el suministro de un anticuerpo marcado con una enzima, por ejemplo, comúnmente, peroxidasa de rábano picante, y entonces esta unión se detecta por medio del suministro de sustrato para esta enzima. En la aplicación del reactivo, es posible, aunque no se prefiere, usar sólo una matriz de donador prensada positivamente para exponer este componente de la membrana durante un período definido.

Lo más conveniente es llevar a cabo el método de las realizaciones divulgadas en la presente a temperatura ambiente, pero también se pueden utilizar temperaturas elevadas y más bajas. Esto se puede efectuar al calentar el dispositivo, su entorno (como en una caja de calor o una caja de enfriamiento) o los líquidos utilizados en el sistema.

Las transferencias se pueden analizar secuencialmente con múltiples anticuerpos o sondas en el presente dispositivo y procesarse al extraer los anticuerpos previamente unidos de la transferencia, seguido por incubaciones posteriores con anticuerpos u otras sondas específicas de otras proteínas diana. El proceso de extracción interrumpe los enlaces de antígeno-anticuerpo y disuelve los anticuerpos en el agente amortiguador circundante. Esto usualmente se logra por una combinación de detergente y calor o por exposición a ya sea pH alto o bajo. El dispositivo, en combinación con el distribuidor de flujo, permite la extracción de transferencias utilizando el método de pH alto o bajo. El re-sondeo posterior de las transferencias, ya sea directamente (por ejemplo, utilizando el mismo distribuidor de flujo utilizado para la extracción) o posteriormente después del almacenamiento, utilizaría el mismo protocolo que el sondeo inicial. Los kits adecuados para la transferencia de tiras están disponibles de Chemicon International, Inc bajo las marcas de kit ReBlot^{MR} Plus (catálogo # 2500), solución ReBlot Plus-Mild (catálogo # 2502) y solución ReBlot Plus-Strong (catálogo #2504).

En la transferencia Western estándar, el antígeno o diana se transfiere a un soporte de membrana y se sondea con una sonda adecuada tal como un anticuerpo, proteína (por ejemplo, proteína A) o lectina (proteínas o glicoproteínas que se unen a porciones carbohidrato). En algunas aplicaciones, se utiliza un formato inverso (por ejemplo, arreglo inverso), en donde el anticuerpo u otras sondas se colocan en una membrana u otro soporte (habitualmente en un formato de arreglo) y el antígeno o diana se presenta a los anticuerpos inmovilizados en el arreglo. La visualización de un evento de unión diana-sonda se puede lograr al marcar los antígenos o dianas o al usar un anticuerpo secundario específico para la diana. Los arreglos inversos a menudo emplean mezclas de dianas, por ejemplo, lisados marcados con diferentes colores fluorescentes para permitir el procesamiento paralelo. Los ensayos inversos también se pueden realizar con las realizaciones divulgadas en la presente.

REIVINDICACIONES

1. Un retenedor de membrana de transferencia para realizar inmunoensayos, que comprende un bastidor (40) y una malla de polipropileno no tejida (47) como un soporte sólido,

en donde el bastidor (40) tiene un borde de perímetro y se configura para soportar una membrana de transferencia (45), y un distribuidor de flujo (46) se une al bastidor (40), y
en donde una hoja de papel se lamina a un lado de esta malla de polipropileno, en donde la malla de polipropileno se une al bastidor (40) a lo largo de un borde,
en donde, cuando el retenedor de membrana de transferencia está cerrado, una membrana de transferencia (45) se va a intercalar entre la malla de polipropileno no tejida (47) y el distribuidor de flujo (46).

2. Un uso del retenedor de membrana de transferencia como se reivindica en la reivindicación 1 en un dispositivo para realizar inmunoensayos, el dispositivo que comprende un colector de vacío (8) que tiene una base (42), la base (42) que tiene una superficie de soporte superior (44) para soportar uno o más portadores (10) que contienen este retenedor de membrana de transferencia (2) que se va a procesar, y un drenaje por debajo de la superficie de soporte superior (44), la superficie de soporte superior (44) que contiene una o más aberturas centrales que se extienden a través de ella y la una o más aberturas centrales están en alineación con el uno o más portadores.

3. El uso de la reivindicación 2, donde la base (42) tiene múltiples estaciones para colocar múltiples portadores (10).

4. El uso de la reivindicación 2, donde la base (42) tiene múltiples estaciones para colocar múltiples portadores (10) y cada portador (10) en cada estación se subdivide en dos o más pocillos.

5. El uso de la reivindicación 2, donde la base (42) tiene uno o más controles (62) para gestionar y monitorear el colector (8) y su operación.

6. El uso de la reivindicación 2, donde la base (42) tiene múltiples estaciones y una fuente de presión común para cada estación.

7. El uso de la reivindicación 2, donde la base (42) tiene múltiples estaciones que tienen una región de recepción de portador, en donde en cada región de recepción de portador de estación la presión es capaz de controlarse individualmente.

8. El uso de la reivindicación 3 o 4, donde los portadores (10) se componen de una placa superior (12) y una placa inferior (13) y tienen uno o más pocillos (22) unidos a la superficie superior de la placa superior (12).

9. El uso de la reivindicación 7, donde esta una o más regiones de recepción de portador (55A, 55B) comprenden una pluralidad de nervaduras verticales (56) que reciben los lados inferiores de la placa inferior de portador (13) para retener el portador (10) de una manera estable en el colector (8).

10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, que comprende los pasos de

(a) colocar una membrana de transferencia (45) en una de las superficies de un retenedor abierto (2) tal que la superficie inferior de la membrana de transferencia (45) esté adyacente al soporte poroso (47) y la superficie superior de la membrana de transferencia (45) esté adyacente al distribuidor de flujo (46) cuando el dispositivo se cierra alrededor de las membranas (45) a fin de que no haya ninguna burbuja de aire entre la membrana de transferencia (45) y el distribuidor de flujo (46);
(b) colocar el retenedor (2) dentro del portador (10) que entonces se cierra de manera segura;
(c) colocar el portador (10) sobre o en un colector (8) que tiene un vacío;
(d) encender el vacío;
(e) colocar un líquido en el pocillo (22) de un portador (10); y
(f) continuar el vacío hasta que el líquido se haya movido a través del dispositivo y las membranas.

11. El uso de la reivindicación 10, donde la membrana de transferencia (45) se ha prehumedecido.

12. Un método para realizar inmunoensayos asistidos por vacío en una o más membranas, que comprende los pasos de:

(a) proporcionar un colector de vacío (8), un portador (10) para retener un retenedor (2), el portador (10) que se forma de una placa superior (12) y una placa inferior (13) cada una con al menos una abertura formada a través de su espesor para permitir que el fluido fluya a través de la misma, un retenedor (2) para la una o más membranas de transferencia (45), el retenedor (2) que es capaz de colocarse entre las placas superior (12) e inferior (13) del portador (10) y que está en comunicación para fluidos con la al menos una abertura de cada placa del portador (10), el retenedor (2) que se forma de un soporte poroso (47) y un distribuidor de flujo (46) que se retienen juntos,

una o más membranas (45) que contienen una o más entidades biológicas que se van a evaluar, las membranas (45) que se colocan en el soporte poroso (47), un distribuidor de flujo (46) que está en la parte superior de la membrana (45) y el retenedor (2) que se coloca entre las placas superior (12) e inferior (13) del portador (10) tal que el distribuidor de flujo (46) esté adyacente a la superficie inferior o interna de la placa superior (12) y el soporte poroso (47) esté adyacente a la superficie interna o superior de la placa inferior (13), el retenedor (2) que es el retenedor de membrana de transferencia de la reivindicación 1,

(b) adicionar uno o más reactivos a la por lo menos una abertura de la placa superior de portador (12) y aplicar un vacío para tirar de los reactivos hacia la membrana (45) a través de la abertura en la placa superior (12), el distribuidor de flujo (46) y el soporte poroso (47) del retenedor (2) y la abertura de la placa inferior (13), y

(c) adicionar uno o más agentes de lavado al uno o más pocillos (22) y aplicar un vacío para extraer los agentes de lavado y cualquier reactivo no unido a través de la abertura de placa superior, el distribuidor de flujo (46), la membrana (45) y el soporte poroso (47) y la abertura de la placa inferior (13) del portador (10) y hacia el colector de vacío (8) y

(d) repetir los pasos b) y c) una o más veces adicionales según se desee o se requiera.

DIBUJOS

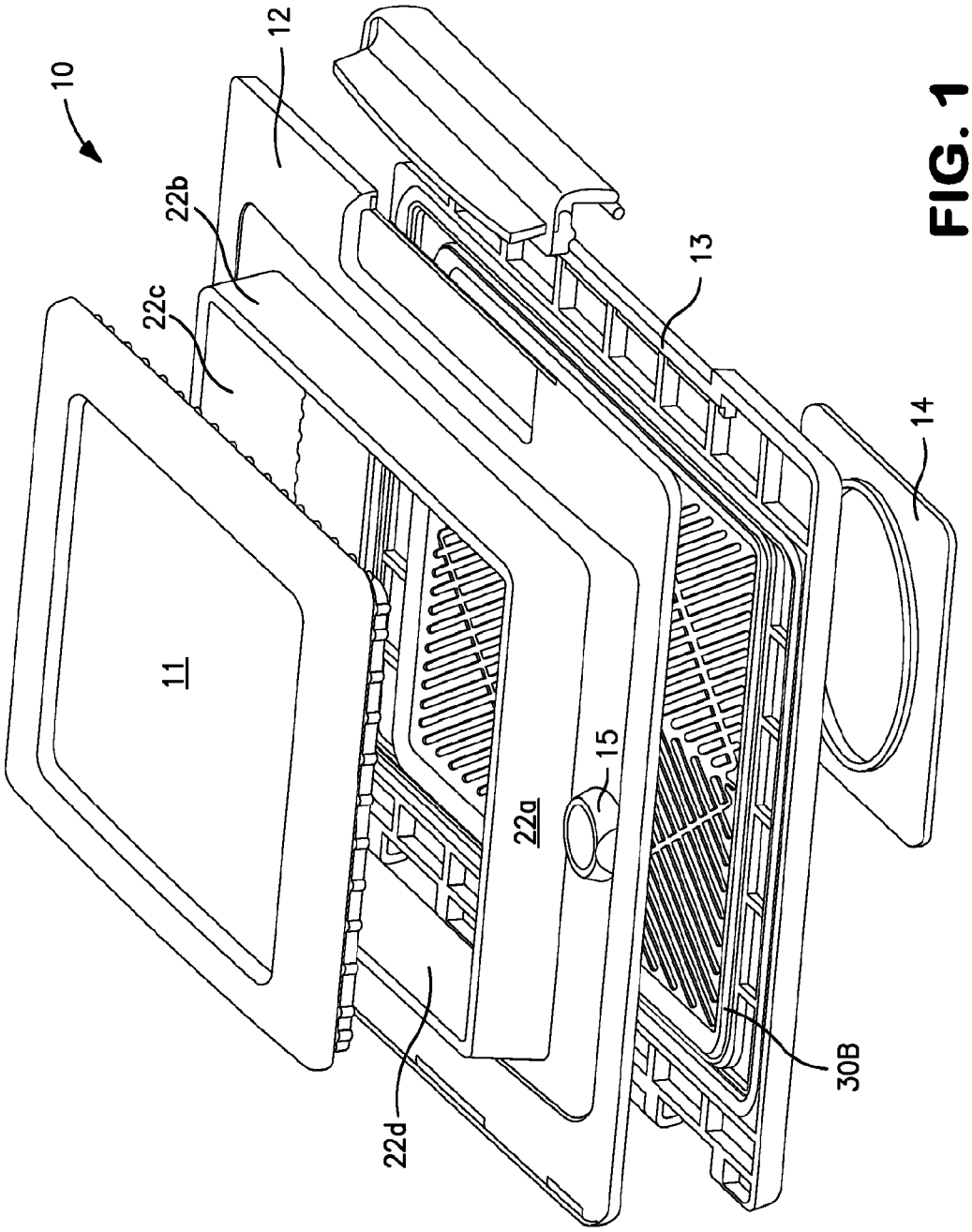

FIG. 1

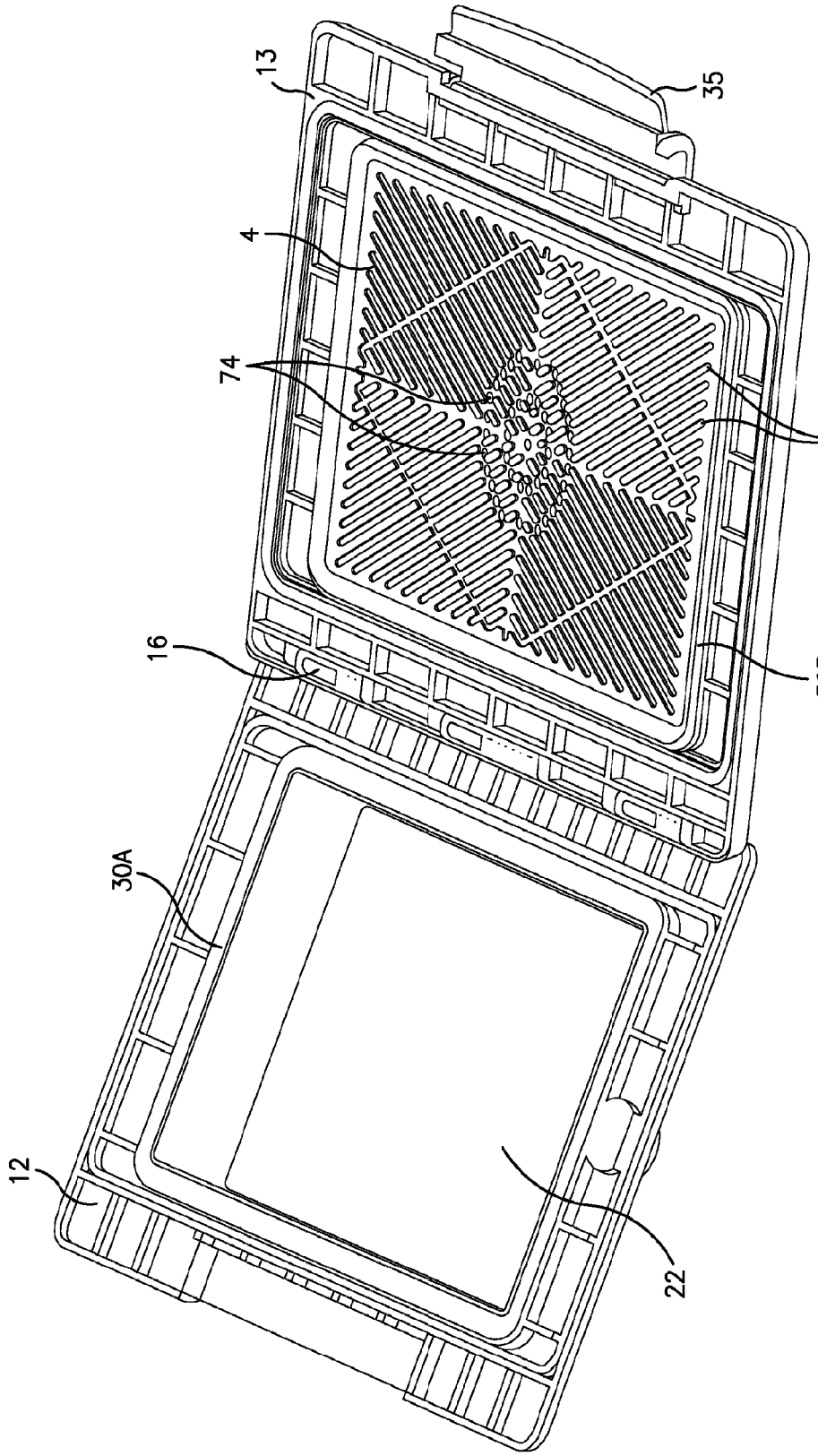

FIG. 2

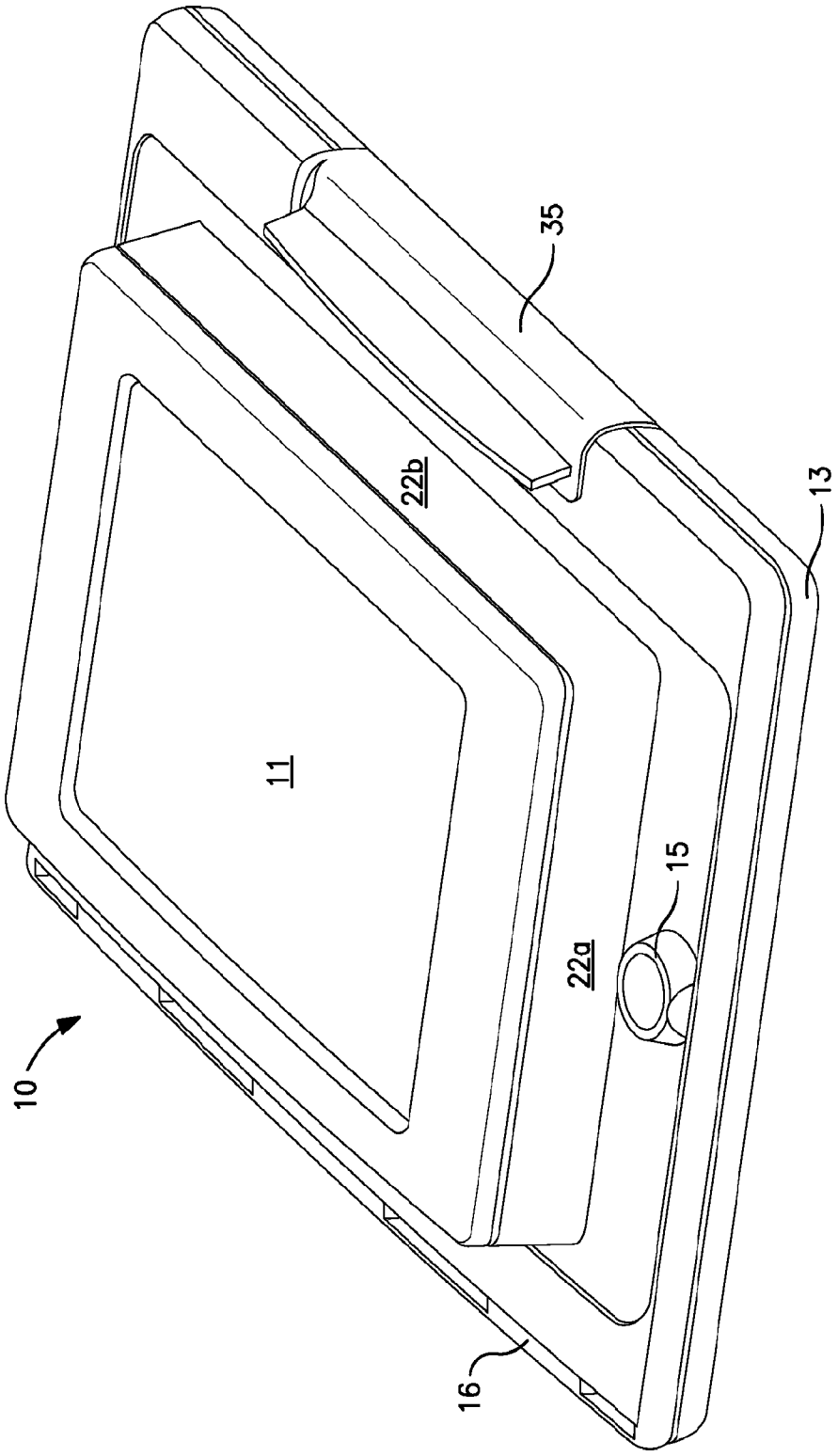

FIG. 3

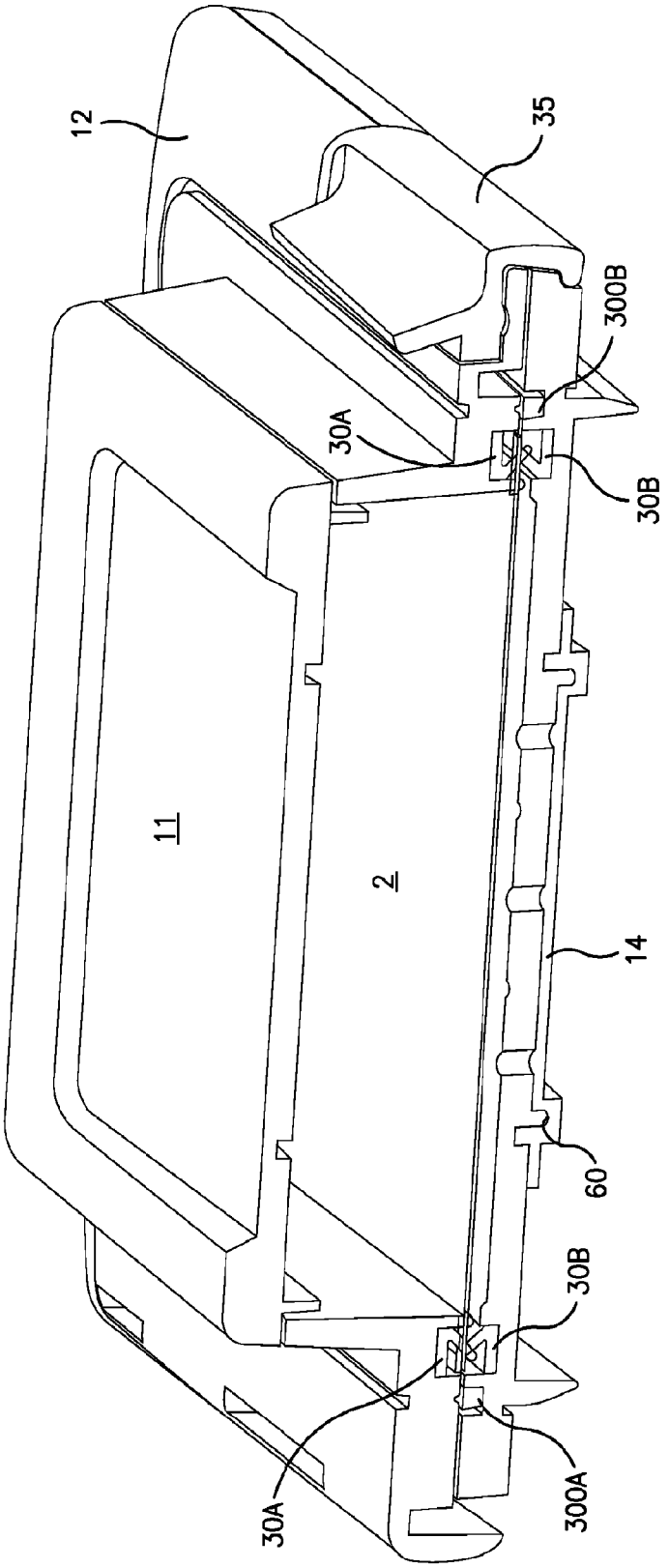

FIG. 4

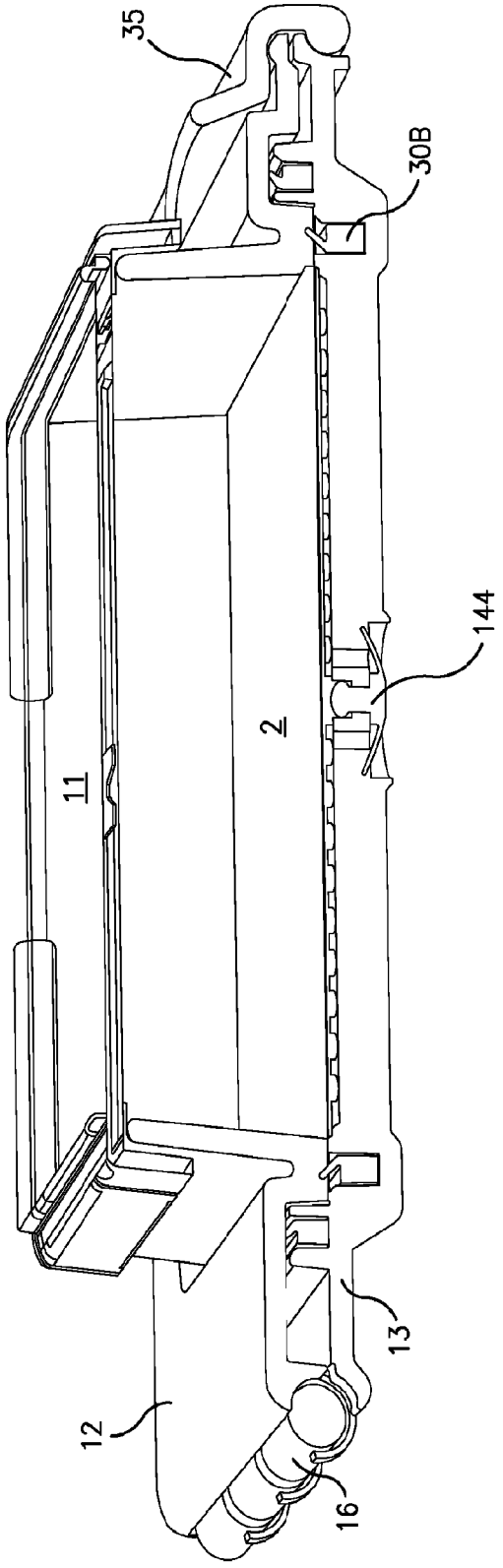

FIG. 4A

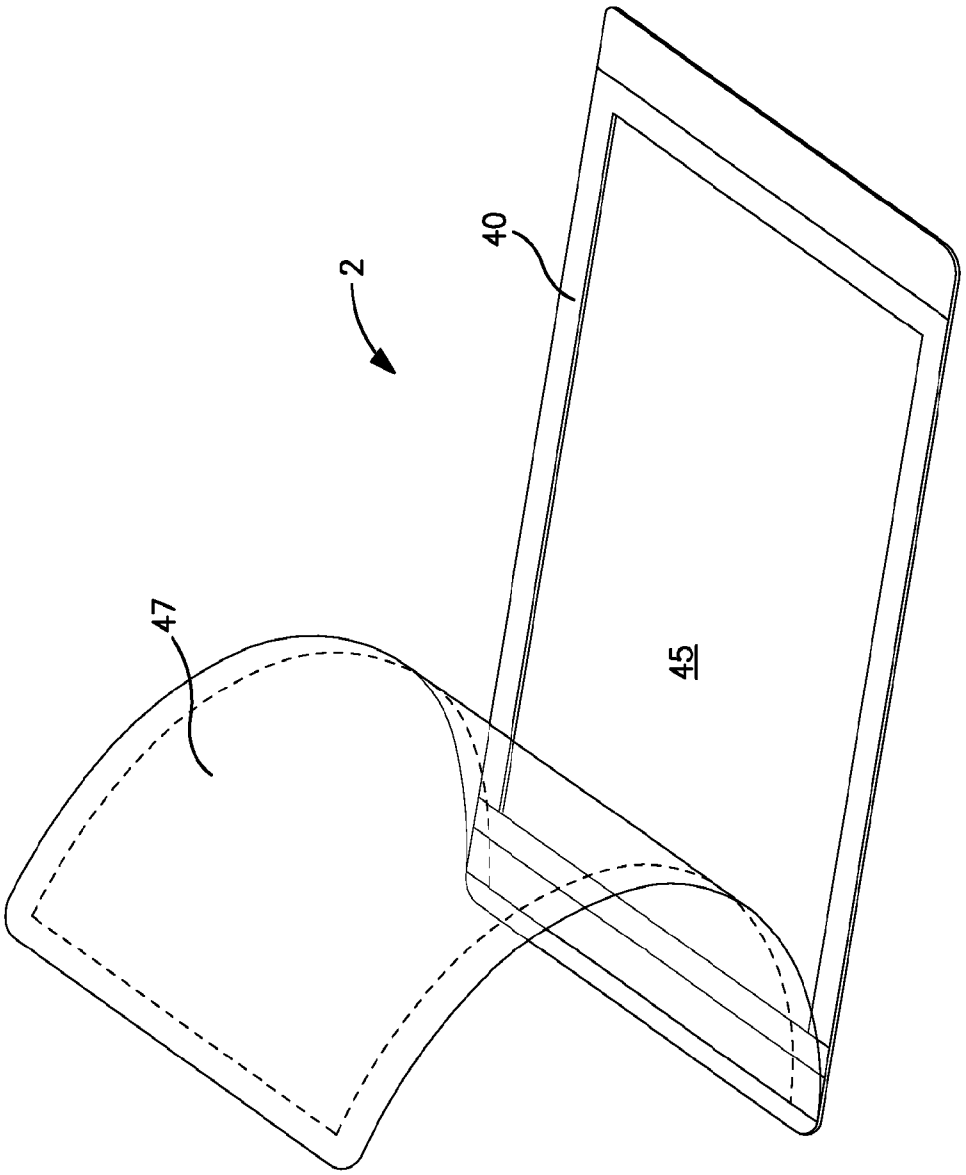

FIG. 5

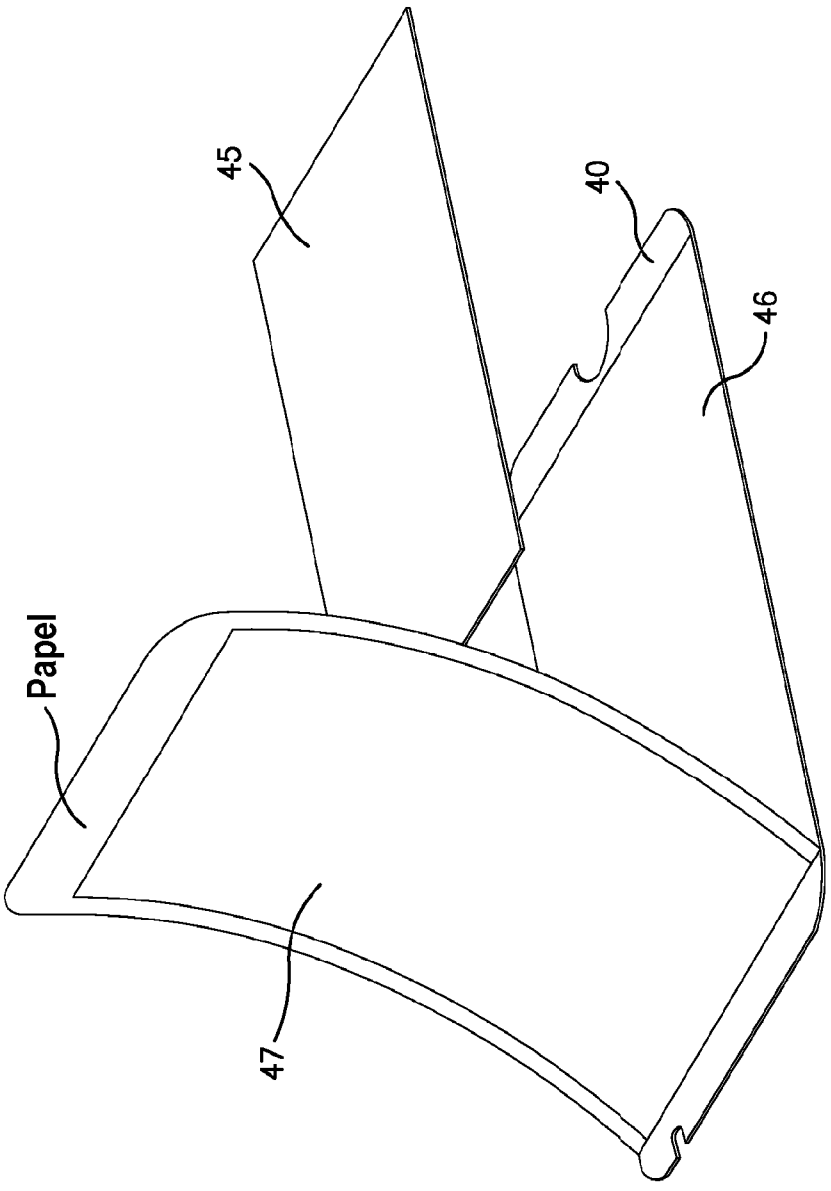

FIG. 5A

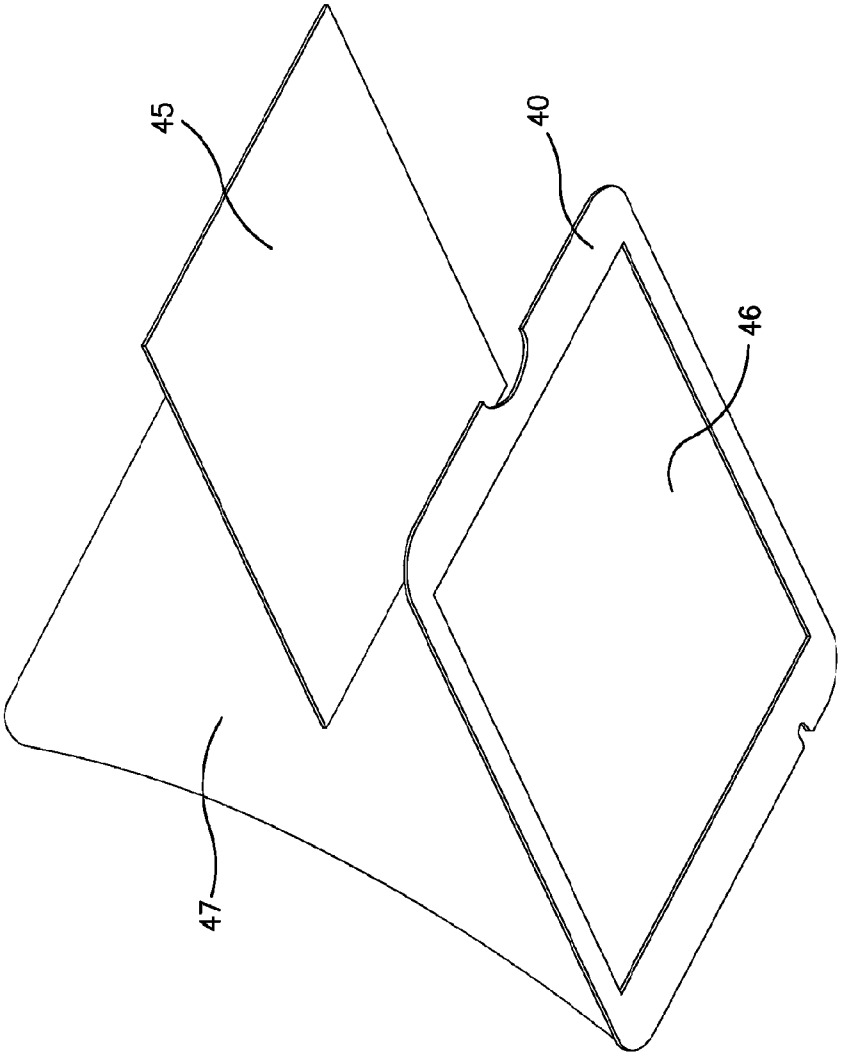

FIG. 5B

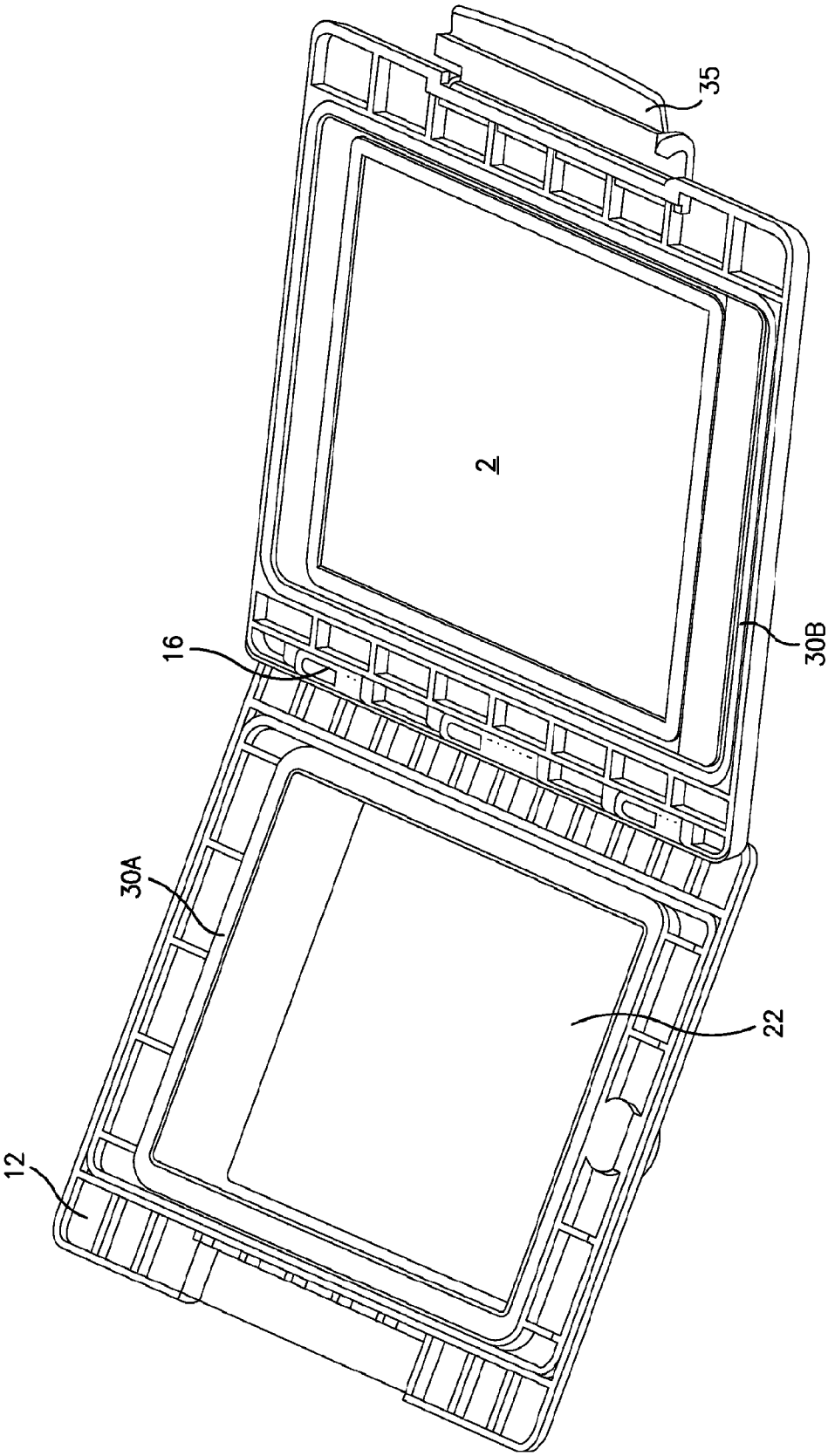

FIG. 6

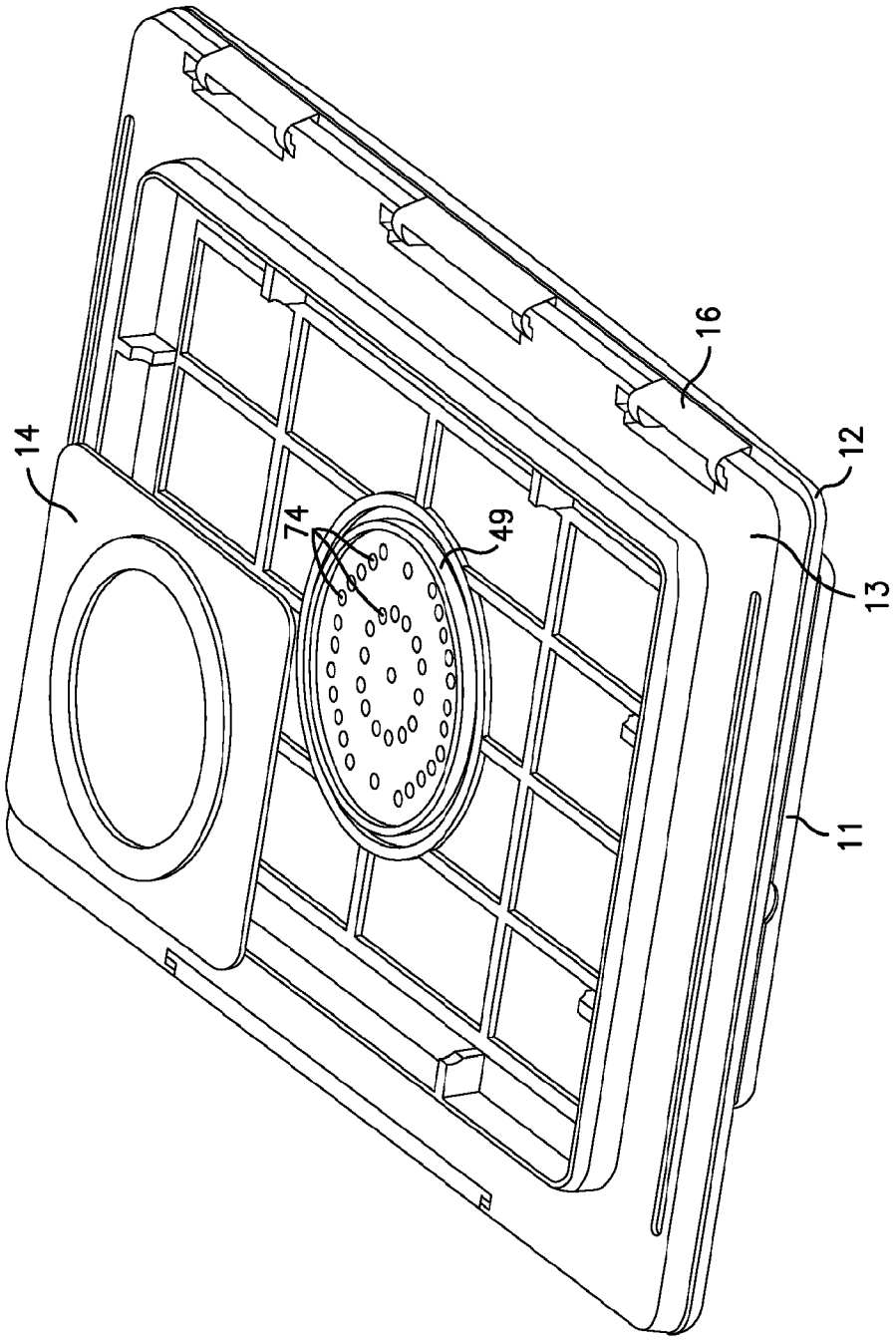

FIG. 7

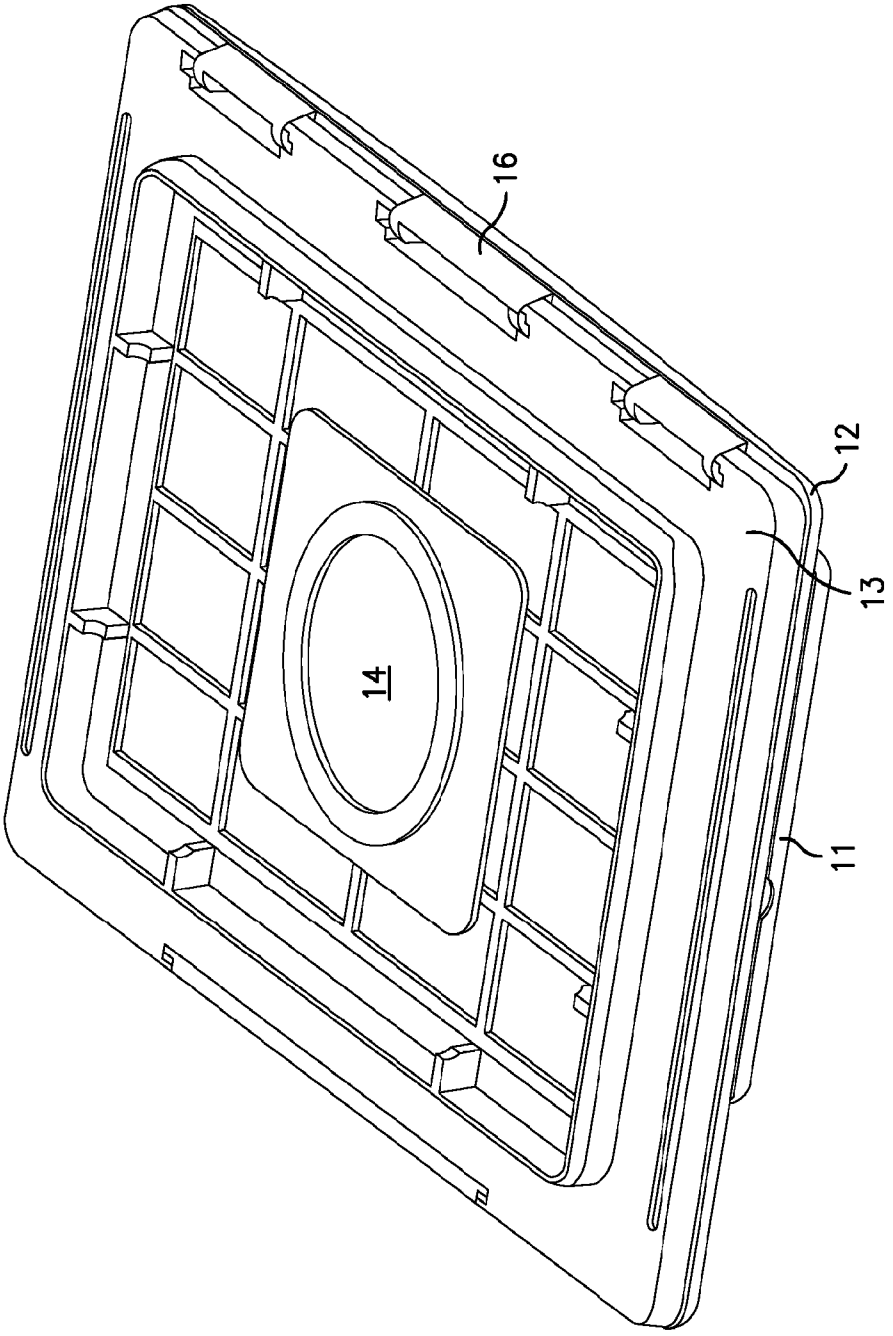

FIG. 8

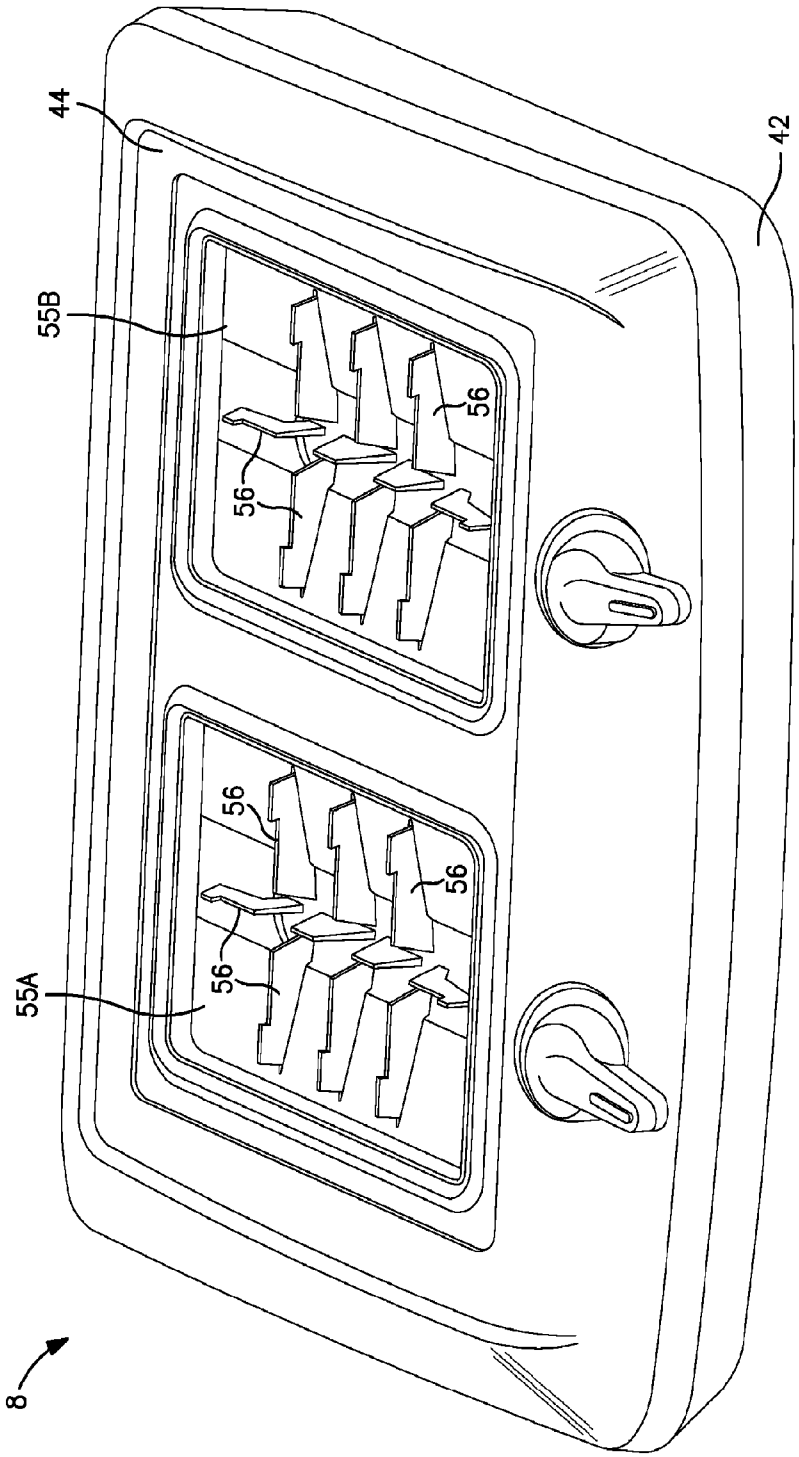

FIG. 9

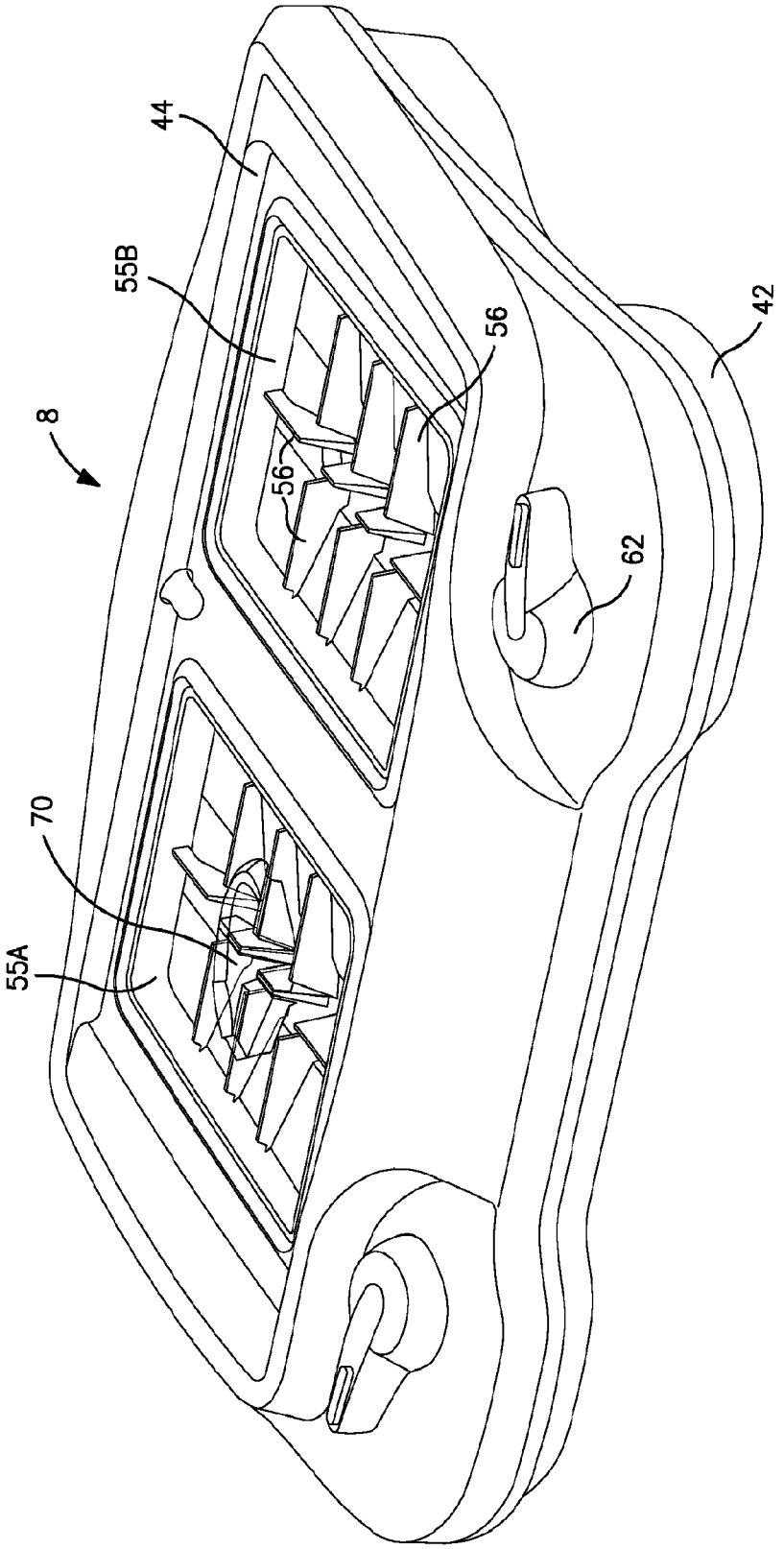

FIG. 9A

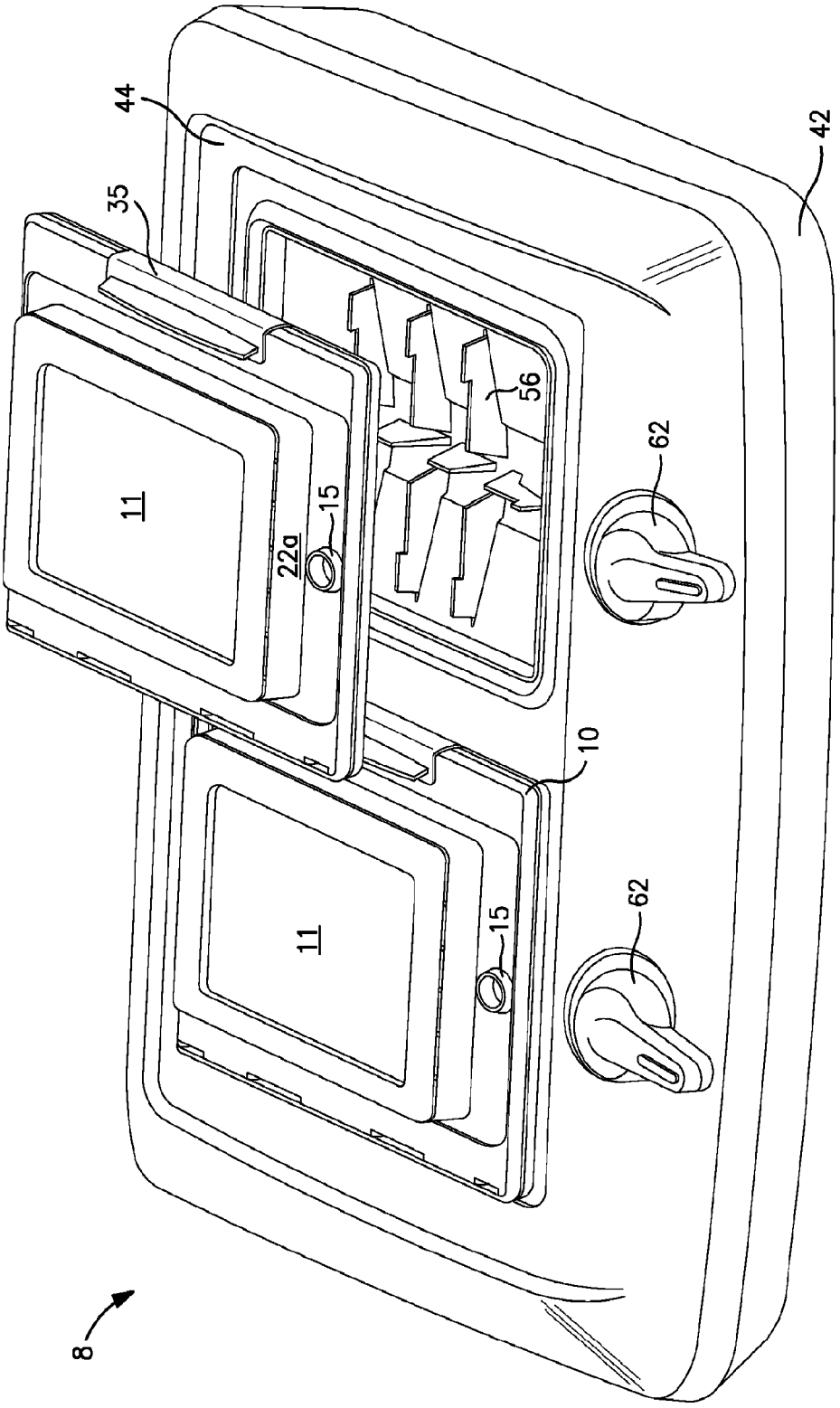

FIG. 10

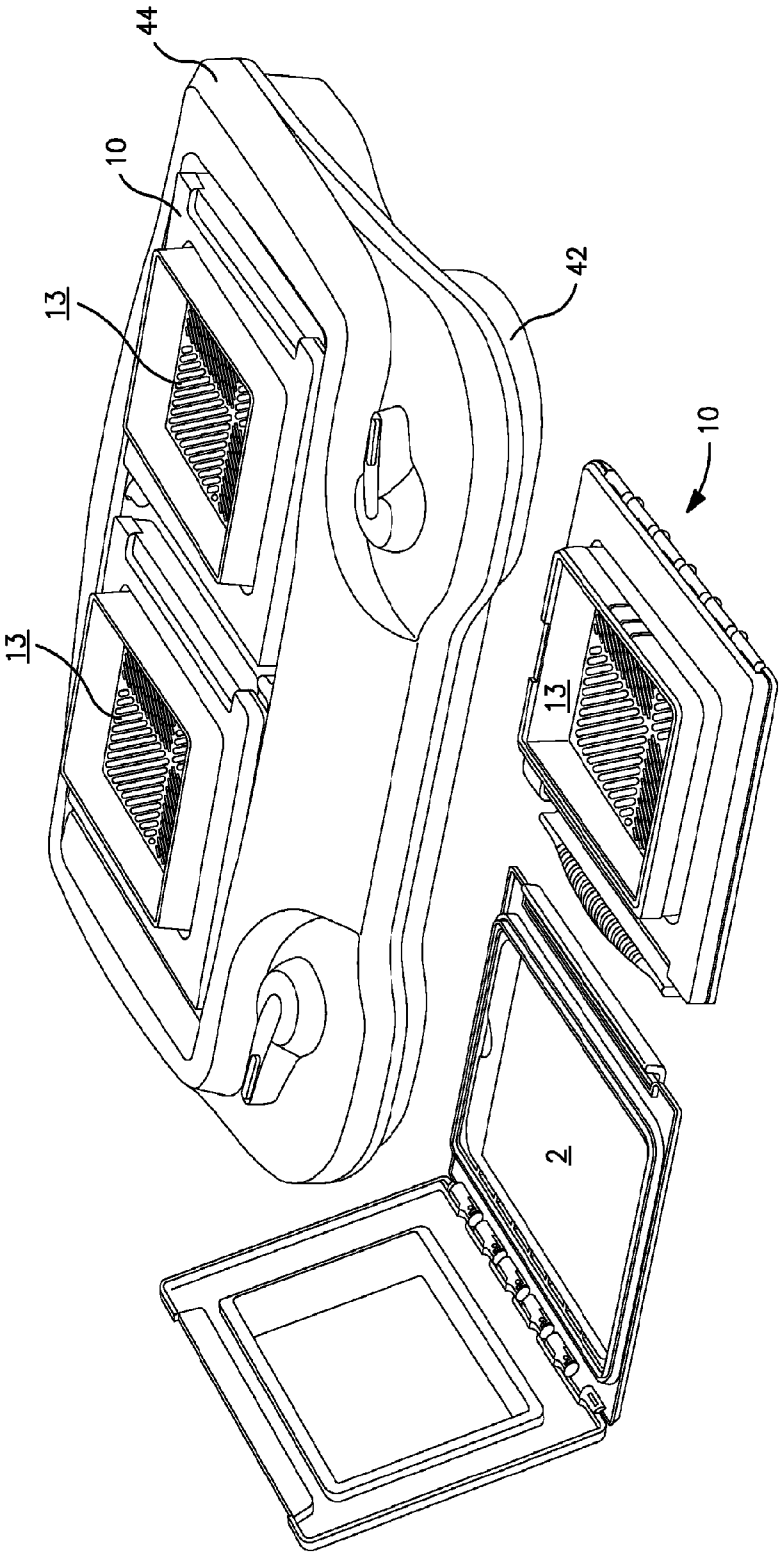

FIG. 10A