



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103339500 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201180060863. 2

G01P 5/00(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 16

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

12/972, 412 2010. 12. 17 US

US 4242194 A, 1980. 12. 30,

US 4242194 A, 1980. 12. 30,

US 2002/0040851 A1, 2002. 04. 11,

US 3870612 A, 1975. 03. 11,

GB 2368904 A, 2002. 05. 15,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 06. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/065673 2011. 12. 16

审查员 刘迎鸣

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/083272 EN 2012. 06. 21

(73) 专利权人 马尔文仪器有限公司

地址 英国伍斯特郡

(72) 发明人 詹森·塞西尔·威廉·科比特

马尔科姆·康纳赫 凯文·马蒂森

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司
11240

代理人 余刚 李静

(51) Int. Cl.

G01N 27/447(2006. 01)

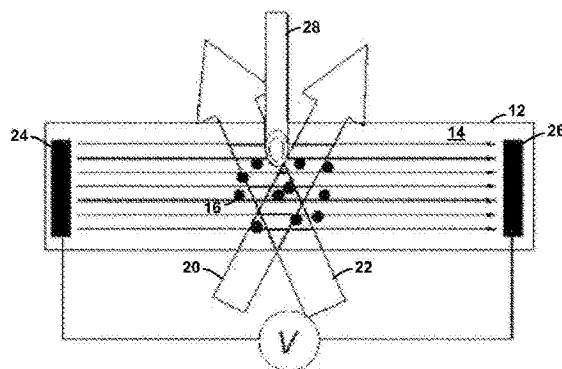
权利要求书2页 说明书4页 附图8页

(54) 发明名称

利用扩散阻挡物的激光多普勒电泳法

(57) 摘要

在一个总体方面中,公开了电泳测量方法,其包括:提供持有分散剂的容器;提供浸渍在分散剂中的第一电极;和提供浸渍在分散剂中的第二电极。将样品放置在第一电极和第二电极之间的分散剂内的位置上,样品与电极分离,在电极上施加交流电场,并且利用时间相干光照明样品。探测来自照明步骤的光中的频移,光在施加交流电场的步骤期间与样品相互作用,和基于探测步骤的结果获得样品的性能。



1. 一种激光多普勒电泳测量方法,包括:

提供保持分散剂的容器;

提供浸渍在所述分散剂中的第一电极;

提供浸渍在所述分散剂中的第二电极;

在所述第一电极与所述第二电极之间的所述分散剂内的位置处放置样品使得该样品能够扩散至所述第一电极和所述第二电极,所述样品被放置在最初与所述第一电极通过包括所述分散剂的第一扩散阻挡物分离的和与所述第二电极通过包括所述分散剂的第二扩散阻挡物分离的位置处;

在所述第一电极和所述第二电极上施加交流电场;

利用时间相干的光来照明所述样品的散射体积;

探测来自所述照明步骤的光中的频移,所述光在施加交流电场的步骤期间与所述样品相互作用,

其中,在大量所述样品扩散至所述第一电极和所述第二电极中的任一个之前,或者在在所述第一电极和所述第二电极处由所述样品形成的聚合物迁移回至光散射体积之前进行所述探测;和

基于所述探测步骤的结果而获得所述样品的性能。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,放置所述样品的步骤包括将所述样品注射入所述分散剂中。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,放置所述样品的步骤是吸引所述样品通过所述容器的过程的一部分。

4. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括在大量所述样品扩散至所述第一电极和所述第二电极中的任一个之前回收所述样品的步骤。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述样品是柔软样品。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述样品是蛋白质样品。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中,放置所述样品的所述步骤将所述样品放置在通过不同于所述分散剂的阻挡物与所述第一电极和所述第二电极分离的位置处。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述获得步骤包括从所述样品的电泳迁移率值获得动电位值。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述照明步骤采用激光。

10. 一种激光多普勒电泳仪器,包括:

第一电极;

第二电极;

保持分散剂的容器,其中样品位于所述分散剂中与所述第一电极通过包括分散剂的第一扩散阻挡物分离的和与所述第二电极通过包括所述分散剂的第二扩散阻挡物分离的位置,使得所述样品能够扩散至所述第一电极和第二电极,

用于将交流电场施加在所述第一电极和所述第二电极上的装置,

时间相干照明源,定位成照明所述样品的光散射体积;和

频移探测器,定位成在与所述样品相互作用之后接收来自所述样品的照明;

其中,所述电泳仪器设计为在通过施加交流电场的所述装置在所述第一电极和所述第

二电极上施加电场的时候照明所述样品的所述光散射体积,并且所述探测器设计为在:

- i) 大量的所述样品已经扩散至所述第一电极和所述第二电极中的任一个之前,或者
- ii) 在所述第一电极和所述第二电极处由所述样品形成的聚合物已经迁移回至所述光散射体积中之前,

探测散射的光中的频移。

11. 根据权利要求 10 所述的仪器,进一步包括样品引入通道,以将样品引入到所述容器中的样品位置上。

12. 根据权利要求 11 所述的仪器,其中,所述样品引入通道包括针状物。

13. 根据权利要求 11 所述的仪器,其中,所述样品引入通道包括端口。

14. 根据权利要求 10 所述的仪器,进一步包括样品取出通道,以将所述容器中的所述样品位置处的所述样品取出。

15. 根据权利要求 10 所述的仪器,其中,所述第一扩散阻挡物和所述第二扩散阻挡物包括导电凝胶。

16. 根据权利要求 10 所述的仪器,其中,所述容器是大体直立的 U 形容器。

17. 根据权利要求 16 所述的仪器,其中,所述 U 形容器进一步包括样品引入端口,所述样品引入端口的开口邻近所述 U 形容器的开口。

18. 根据权利要求 16 所述的仪器,其中,所述 U 形容器进一步包括样品取出端口,所述样品取出端口的开口邻近所述 U 形容器的开口。

19. 根据权利要求 16 所述的仪器,其中,所述 U 形容器进一步包括样品引入端口和样品取出端口,所述样品引入端口和所述样品取出端口中的每一个的开口邻近所述 U 形容器的开口。

20. 根据权利要求 10 所述的仪器,其中,所述容器是一次性塑料容器。

21. 根据权利要求 10 所述的仪器,其中,所述时间相干照明源是激光。

22. 根据权利要求 11 所述的仪器,进一步包括动电位获得单元,以从通过用于所述样品的所述探测器测量的电泳迁移率而获得动电位值。

利用扩散阻挡物的激光多普勒电泳法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于执行电泳测量的方法和装置,包括利用扩散阻挡物的激光多普勒电泳法。

背景技术

[0002] 存在许多用于测量柔软样品的电泳迁移率的技术,如毛细管区电泳法、膜约束稳态电泳(membrane confined steady state electrophoresis)、提塞留斯氏(Tiselius)电泳仪和电泳光散射,包括激光多普勒电泳法(LDE)。LDE 在施加外部电场的情况下通过测量质点运动而测量微粒的迁移率。参考图 1,将微粒 16 分散在缓冲液 14 中,并将电极 24、26 浸渍在样品中。施加电场,并且可在非常高的缓冲液电导率上,以及在电极表面上发生样品的降解。对于蛋白质样品,也认为,在电极表面上的氧化还原反应电离了形成聚合物 18 的蛋白质结构内的结合,然后将二者粘附到电极表面上,和将其分散到剩余的样品中。由于高的样品成本和 LDE 测量最佳化的重复性质,与 LDE 通常相关的体积也可以是有问题的。

发明内容

[0003] 在一个总体方面中,本发明的特点在于电泳测量方法,其包括:提供保持分散剂的容器;提供浸渍在分散剂中的第一电极;和提供浸渍在分散剂中的第二电极。将样品放置在第一电极和第二电极之间的分散剂内的位置上,样品与电极分离,在电极上施加交流电场,和利用暂时地相干光照明样品。探测在来自照明步骤的光中的频移,光在施加交流电场的步骤期间与样品相互作用,并且基于探测步骤的结果获得样品的性能。

[0004] 在优选的实施例中,放置样品的步骤可包括注射样品。放置样品的步骤可是通过容器吸入样品的过程的一部分。该方法可进一步包括回收样品的步骤。样品可以是柔软样品。样品可以是蛋白质样品。放置样品的步骤可将样品放置在通过分散剂与电极分离的位置上。放置样品的步骤可将样品放置在通过不同于分散剂的阻挡物与电极分离的位置上。获得步骤可包括,从样品的电泳迁移率值获得动电位(zeta potential)值。探测步骤进行的时间可以短于利用施加的交流电能够将大量样品扩散到第一电极和第二电极的时间。照明步骤可采用激光。

[0005] 在另一个总体方面中,本发明的特点在于电泳仪器,其包括容器、第一电极、第二电极。第一扩散阻挡物位于样品位置和第一电极之间,并且第二扩散阻挡物位于样品位置和第二电极之间。时间相干照明源定位成,照亮样品位置,并且频移探测器定为成在与样品相互作用之后接收来自样品位置的照明。

[0006] 在优选的实施例中,仪器可进一步包括样品引入通道,以便在容器中的样品位置上引入样品。样品引入通道可包括针状物。样品引入通道可包括端口。仪器可进一步包括样品取出通道,以便在容器中的样品位置上取出样品。第一扩散阻挡物可包括大量的分散剂,并且第二扩散阻挡物包括大量的分散剂。第一和第二扩散阻挡物可包括传导凝胶。容器可以是大体直立的 U 形容器。U 形容器可进一步包括样品引入端口,其开口临近 U 形容器

的开口。U 形容器可进一步包括样品取出端口,其开口临近 U 形容器的开口。U 形容器可进一步包括样品引入和取出端口,其具有各自临近 U 形容器的开口的开口。容器可以是一次性塑料容器。光源可以是激光。仪器可进一步包括动电位获得单元,以便从通过样品的探测器测量的电泳迁移率获得动电位值。

[0007] 通常,这个文件描述扩散阻挡物概念,其中它自身将少量的样品(分散的或另外的)引入到较大的量中,其包括只预填充充分散剂的电极。期望扩散阻挡物通过样品分散到其中的缓冲液,将样品与电极表面隔绝,同时维持与表面的电接触。理想地,在样品迁移到电极之前,或如果在电极上形成的聚合物迁移回到光散射探测体积之前就需要延长的测量持续时间,发生 LDE 测量。默认的是,样品体积也大大地减少,因为,理想地,不在电极上降解样品,然后,为了适当地最佳化测量,可利用显著更多的测量。然后,还可以的是,取决于样品单元(电池, cell)的物理形式,在测量之后回收样品。同时主要地针对蛋白质或其他柔软样品,该技术也可用于通过减少电极的变黑,增加电池寿命。

[0008] 存在许多优选的实施例,包括三个端口电池、四个端口电池和独特的填充当前提议的折叠式毛细管电池(FCC)的方式。这些电池都可以实施作为如在 Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) 中发现的标准的电池固定器的电池。

[0009] 根据本发明的系统可以是有利的,因为他们可有助于避免在电泳迁移率测量中在蛋白质样品上形成聚合物。这可潜在地减少这些测量中错误的来源,因为聚合物可具有完全不同于天然蛋白质自身的迁移率。并且,尽管某些研究者已经显示了,电极的变黑不影响测量质量,但是这种变黑是非常不雅观的,并且市场中的看法是,它指示“肮脏的”并且因此是不能用的电池。

附图说明

[0010] 图 1 是图示现有技术电泳测量的示意图;

[0011] 图 2A 是图示在电泳测量的开始时的根据本发明的电泳装置的示意图;

[0012] 图 2B 是图示在电泳测量期间第一时间段过去之后的图 2A 显示的电泳装置的示意图;

[0013] 图 2C 是图示在电泳测量期间第二时间段过去之后的图 2A 显示的电泳装置的示意图;

[0014] 图 2D 是图示在第三时间段过去之后并且电泳测量完成时的图 2A 显示的电泳装置的示意图;

[0015] 图 3 是根据本发明的 U 形电泳装置的示意图;

[0016] 图 4 是图 3 的 U 形电泳装置的实施的摄影图解;

[0017] 图 5A 是在样品的指令之前显示的根据本发明的 U 形电泳装置的示意图,其装备有引入和取出通道。

[0018] 图 5B 是在样品的引入期间显示的图 5A 的电泳装置的示意图;

[0019] 图 5C 是在样品的电泳迁移率测量之后显示的图 5A 的电泳装置的示意图;

[0020] 图 5D 是在执行迁移率测量的样品的取出之后显示的图 5A 的电泳装置的示意图;

[0021] 图 6 是图 5A 的电泳装置的实施例的示意图;和

[0022] 图 7 是根据本发明的电泳装置的浓度与距离的曲线图。

具体实施方式

[0023] 参考图 2A, 根据本发明的一个方面的示例性的电泳装置包括具有引入通道 28 的电池 12, 如针状物。引入通道允许用户引入样品, 如在与电极分开的位置上, 将蛋白质样品引入到缓冲液 / 分散剂 14 中。

[0024] 参考图 2A-2D, 在操作中, 最初, 仅仅利用缓冲液填充样品电池, 其中, 将样品自身分散到或不将样品自身分散到缓冲液中(参考图 2A)。只将样品添加到在探测体积附近的小区域中, 并且开始测量。进行足够长时间的测量, 以便记录电泳迁移率的精确的估计(参考图 2B-2D), 但是对于样品到达电极来说时间是不够长的。这意味着, 以后在没有电极聚合物存在的情况下, 可回收样品, 虽然是稀释的。

[0025] 参考图 3, 电泳装置可基于直立的 U 形电池 12A, 其中, 将样品 16 注射到电池的底部上的视觉探测区域中。这针对给定着陆部(footprint)提供相对长的通道长度, 以保持作为扩散阻挡物的缓冲液。期望扩散阻挡物通过缓冲液将样品(蛋白质、软样品以及其他)与电极表面隔绝, 同时维持与表面的电接触, 在缓冲液中分散有样品, 用于电泳测量。在另一个实施例中, 可将导电凝胶塞子添加到折叠的电池通道中, 电凝胶塞子诸如琼脂, 其可进一步阻碍扩散。

[0026] 参考图 4, U 形电泳装置可实施作为与现有的光散射测量系统兼容的塑料电池, 可从 Malvern Instruments Ltd of Malvern, UK 得到 Zetasizer Nano, 其在标题为 APPARATUS FOR HIGH-THROUGHPUT SUSPENSION MEASUREMENTS 的 PCT 公开申请 W02010041082 中描述, 其全部内容通过引用包括在此。Zetasizer Nano 可执行不同类型的测量, 但是激光多普勒电泳测量对迁移率测量最敏感。

[0027] 在激光多普勒电泳测量中, 利用激光多普勒测速法的技术来测量颗粒的速度。测量由移动颗粒引起的入射激光束的频移或相移, 作为颗粒迁移率, 并且然后可通过输入分散剂粘度和 Smoluchowski 或 Huckel 理论的应用, 将这种迁移率转换成颗粒的动电位。这些理论大约可用于大多数的应用。可具有较新的模型, 其可给出更精确的转换, 但是需要更多的分散的化学的知识。

[0028] 参考图 5, 多端口折叠的毛细管电池 12C 也可用于执行根据本发明的电泳测量。在图 5A-5D 中概述了基本概念。电池由四个端口组成, 两个仅仅用于稀释液(A 和 B), 而两个仅仅用于样品(C 和 D)。三个端口版本将组合端口 C 和 D 的功能。

[0029] 在操作中, 利用样品分散到其中的缓冲液填充全部的电池 12C (5A)。使样品落入到(滴定到)样品杯 C 中, 并且注射器将样品吸到测量腔中(图 5B)。立即开始 LDE 测量。一旦完成测量(图 5C), 将沿着电池臂以某种方式扩散样品。快速的场测量不受到样品从电极腔到电极腔的电渗“冲激”的影响, 因此, 在它们的顶部使这些腔室保持敞开, 并且通过注射器取回样品来清洁电池, 虽然是以稀释的形式(图 5D)。参考图 6, 也可将多端口的电池设计称为 Zetasizer Nano 的方便的折叠形式。

[0030] 参考图 7, 可利用菲克(Fick's)第一定律来判定具体的测量需要的扩散阻挡物。菲克第一定律描述(在时间 t , 在距离 X 处)来自恒定浓度源 $n(0)$ 的浓度 n , 并且通过下列等式给出:

[0031]
$$n(x,t) = n(0) \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right)$$

(1)

[0032] 其中, $\operatorname{erfc}()$ 是互补误差函数。D 是扩散系数。这里, 我们关注具有利用 Zetasizer Nano ZS 测量的 $D=120 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 的溶菌酶。

[0033] 图 7 显示, 在显著地将溶菌酶样品扩散到距离 $X=0$ 处的源的 30mm 处之前, 需要过去很多小时。利用微电泳的蛋白质迁移率测量所用的时间是大约几分钟到几十分钟。这些是比图 7 中小很多的时间水平(timescale)。可能的是, 对流和残余的电渗将显著地减少图 7 中显示的时间, 但是, 为了突出技术的理论基础, 它可足以作为限制估计。即, 如果需要回收样品, 可在蛋白质迁移到电极表面所用的时间内执行 LDE 测量。或当不需要完整无缺地回收蛋白质样品时, 在蛋白质到达电极所用的时间加上随后的蛋白质 / 电极聚合物从电极回迁到探测区域所用的时间中

[0034] 现在结合它的许多具体的实施例描述本发明。然而, 本领域的技术人员应该知道属于本发明范围的许多更改。例如, 可设计其他电池几何形状和注射和 / 或取出机构, 并且可将方法应用于其他类型的样品。因此, 本发明的范围应该仅仅通过这里所附的权利要求的范围限制。另外, 不应该将权利要求的表现的顺序解释为限制权利要求中的任何具体的特征的范围。

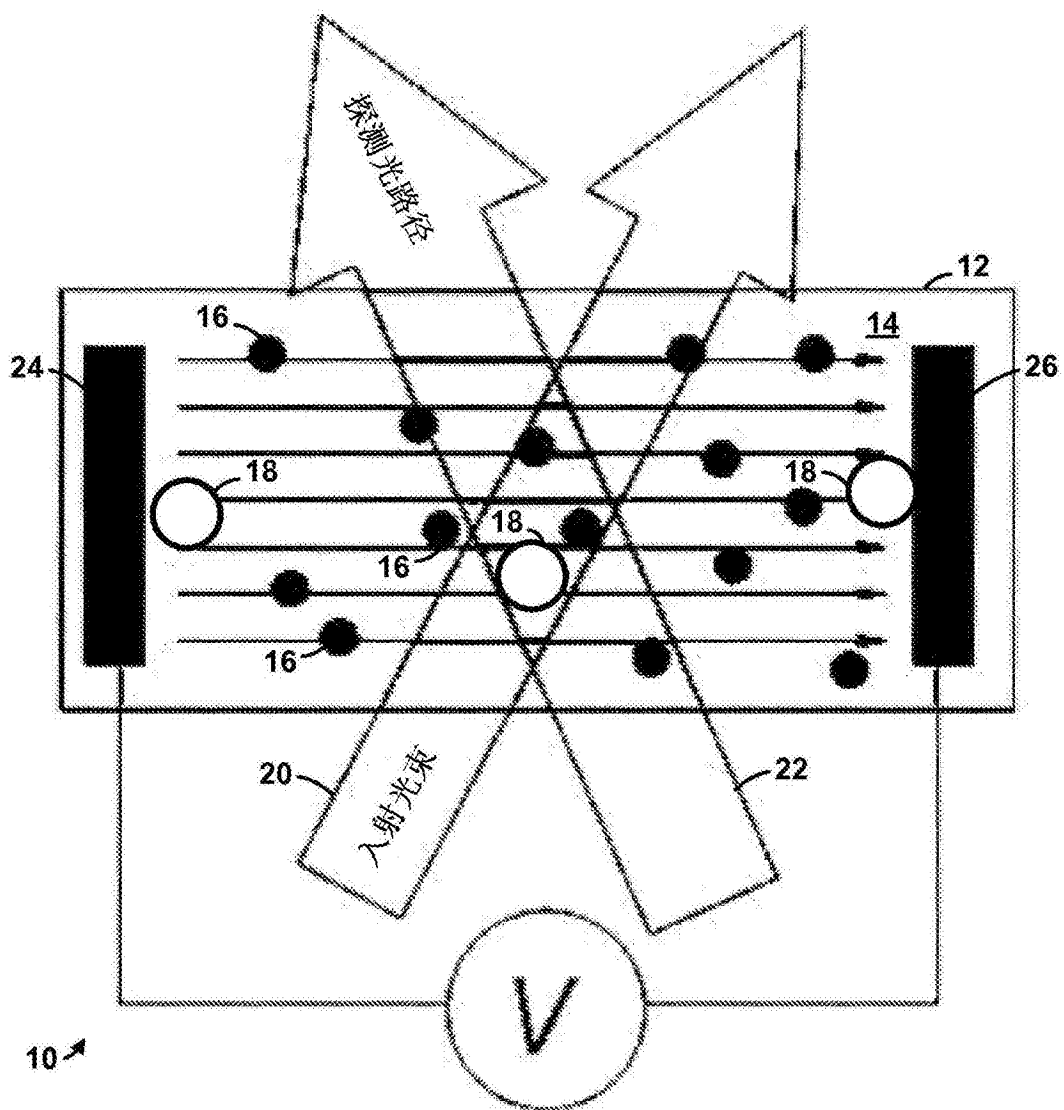


图 1 现有技术

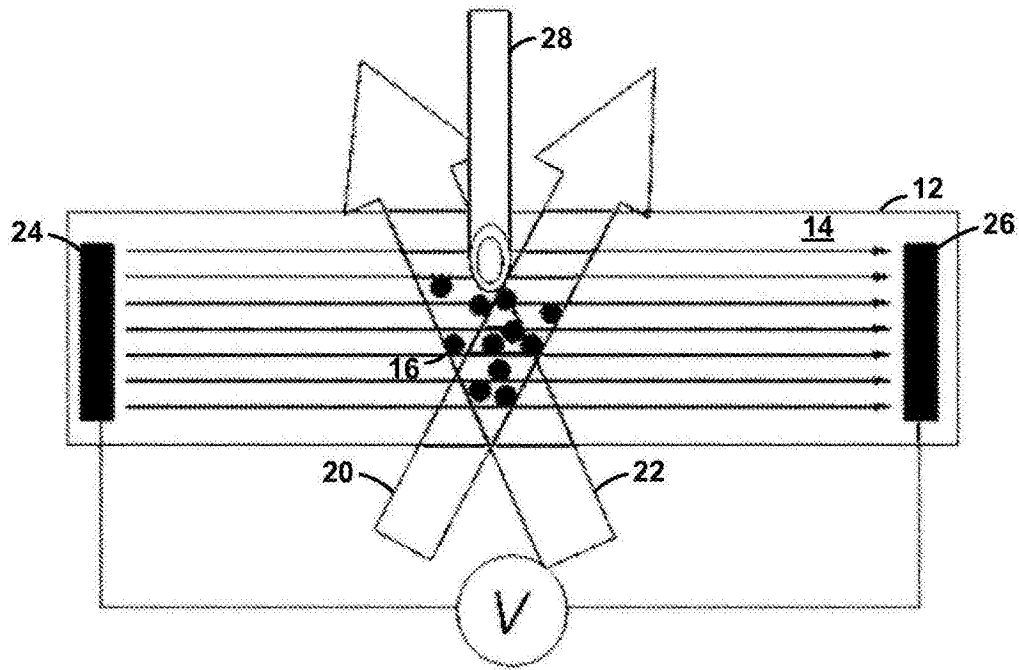


图 2A

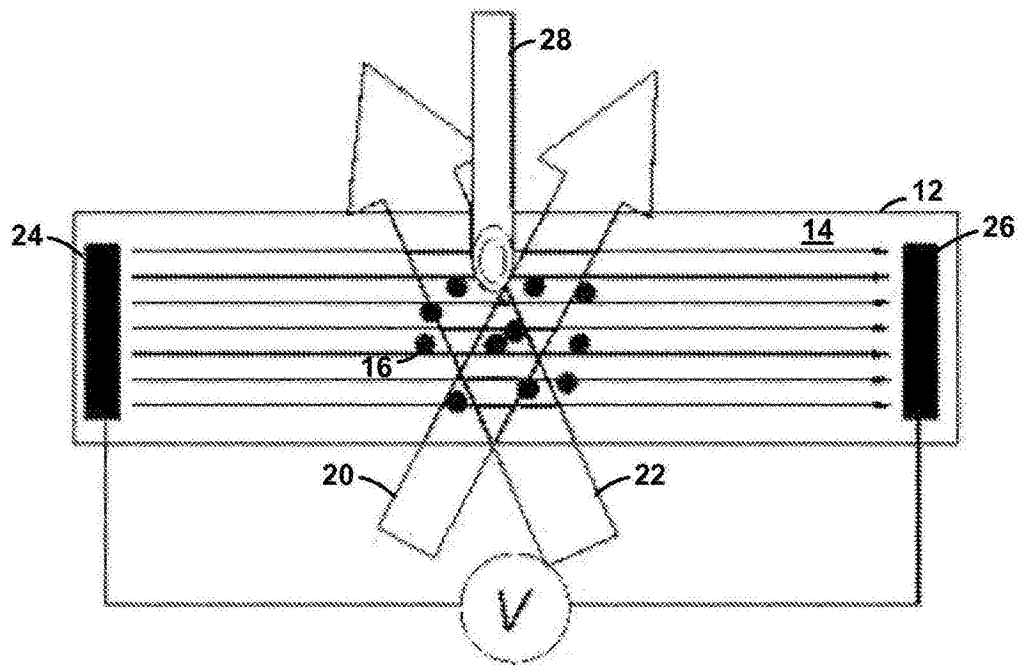


图 2B

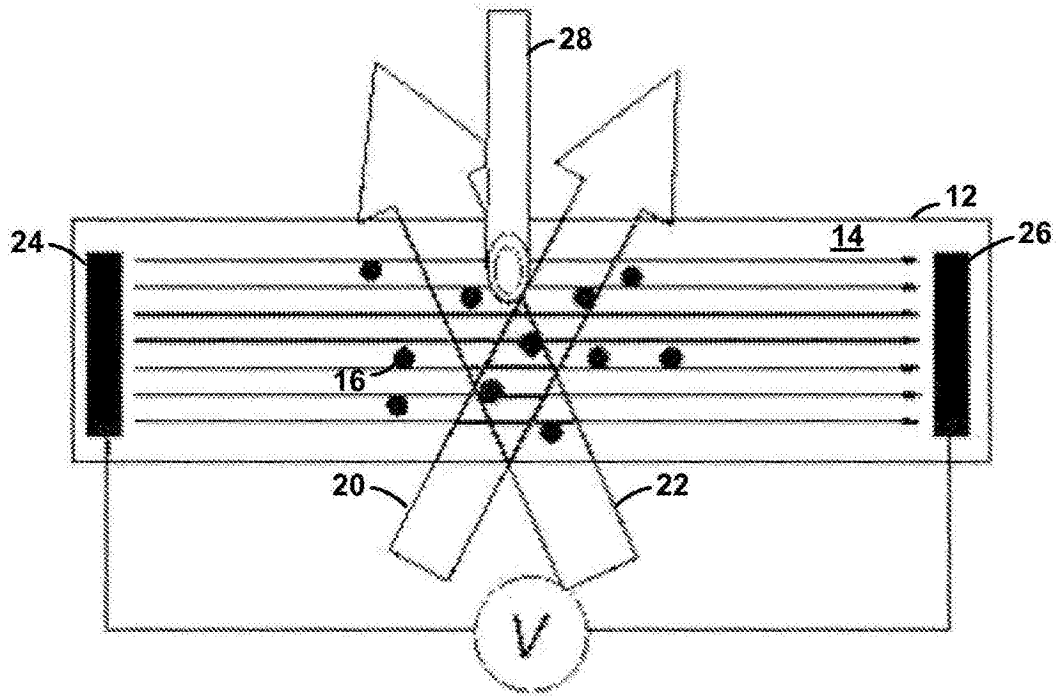


图 2C

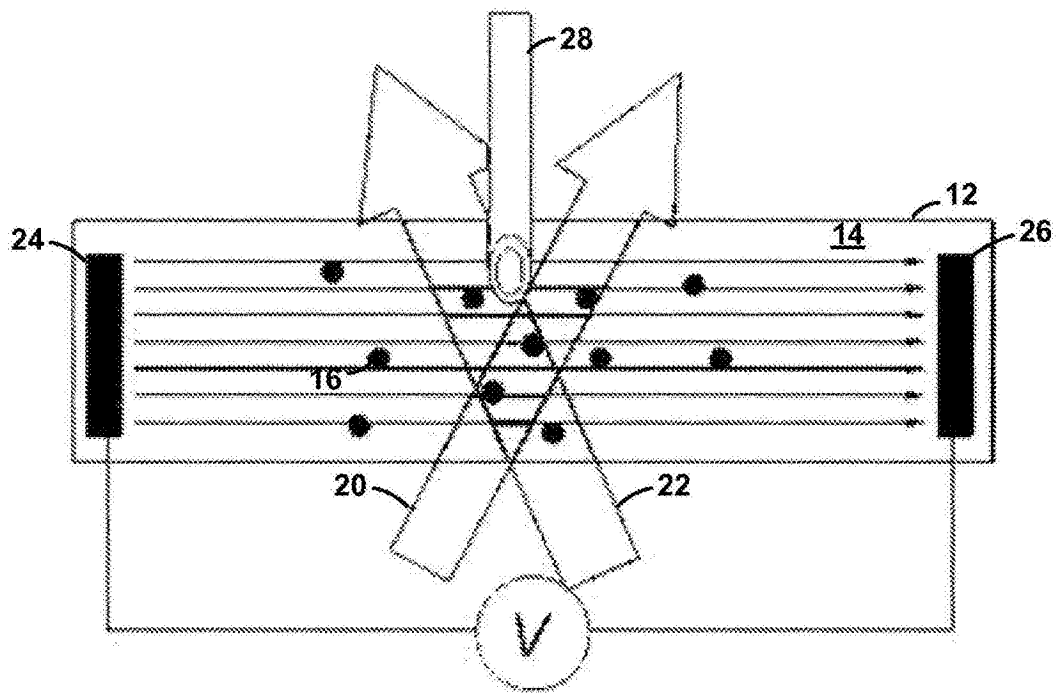


图 2D

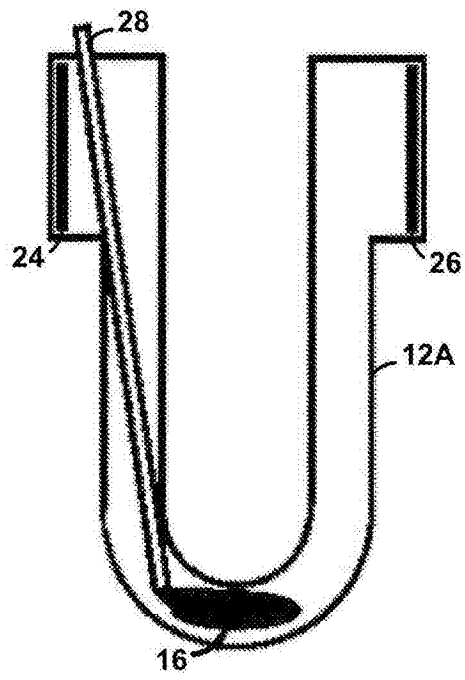


图 3

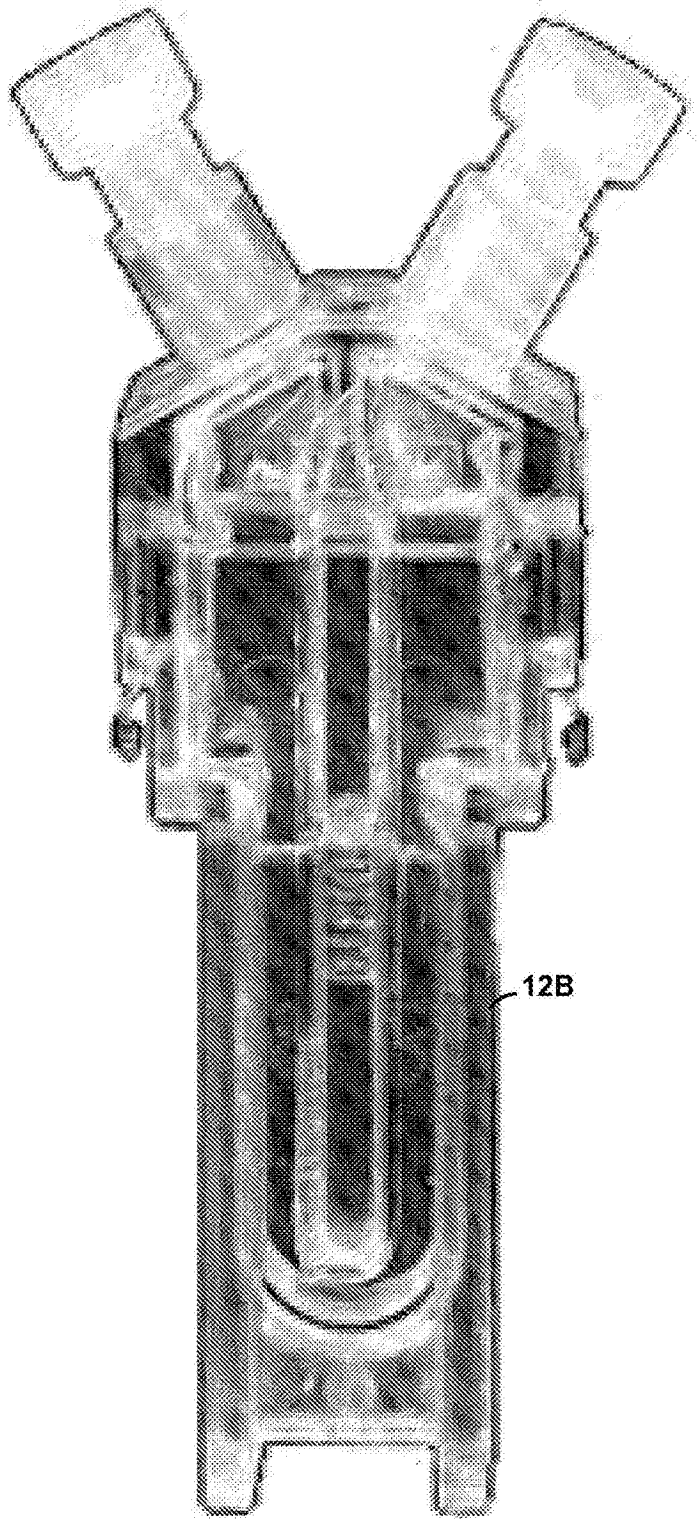


图 4

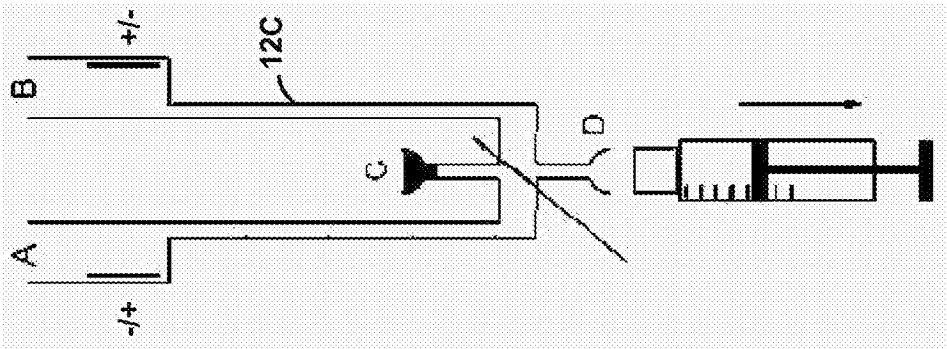


图 5A

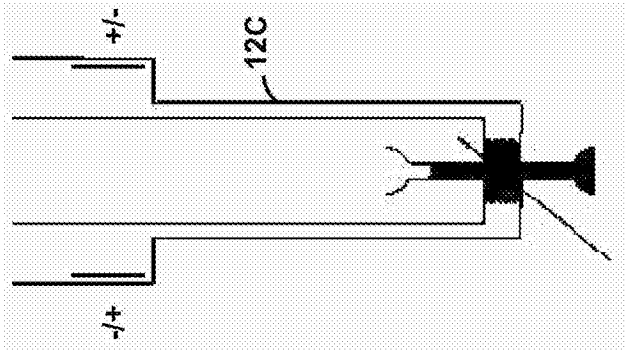


图 5B

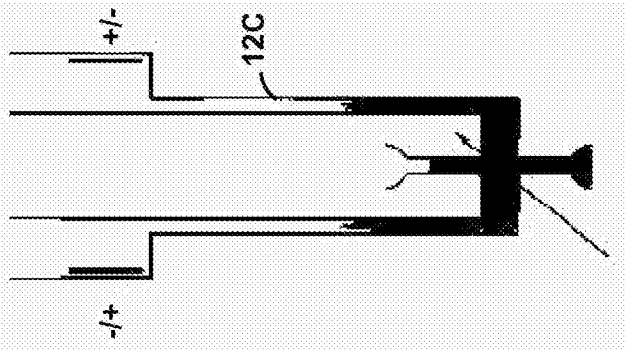


图 5C

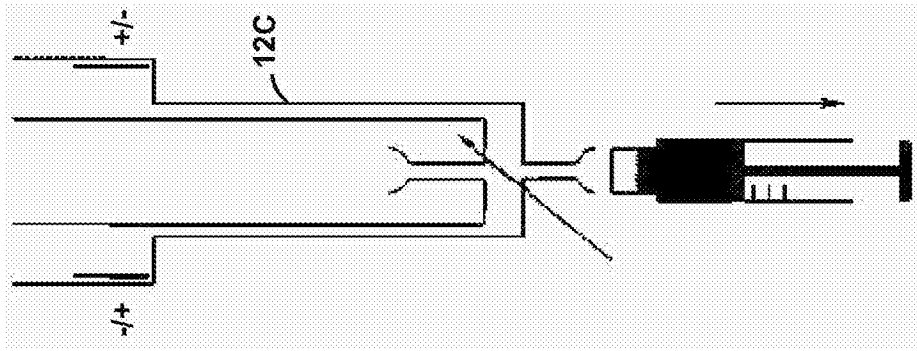


图 5D

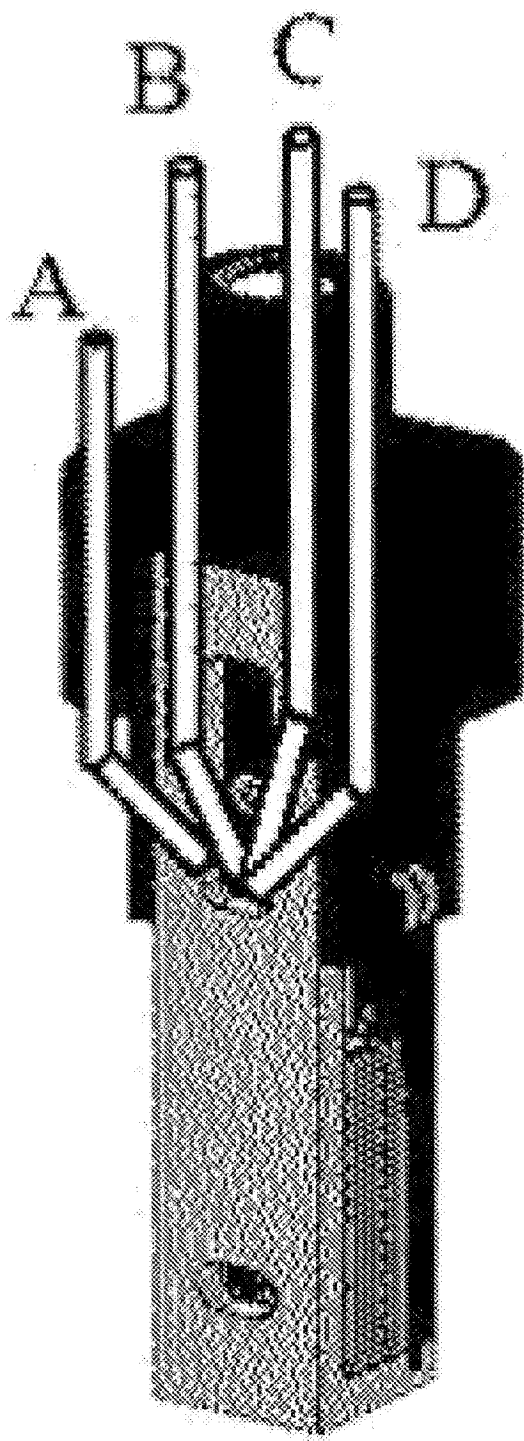


图 6

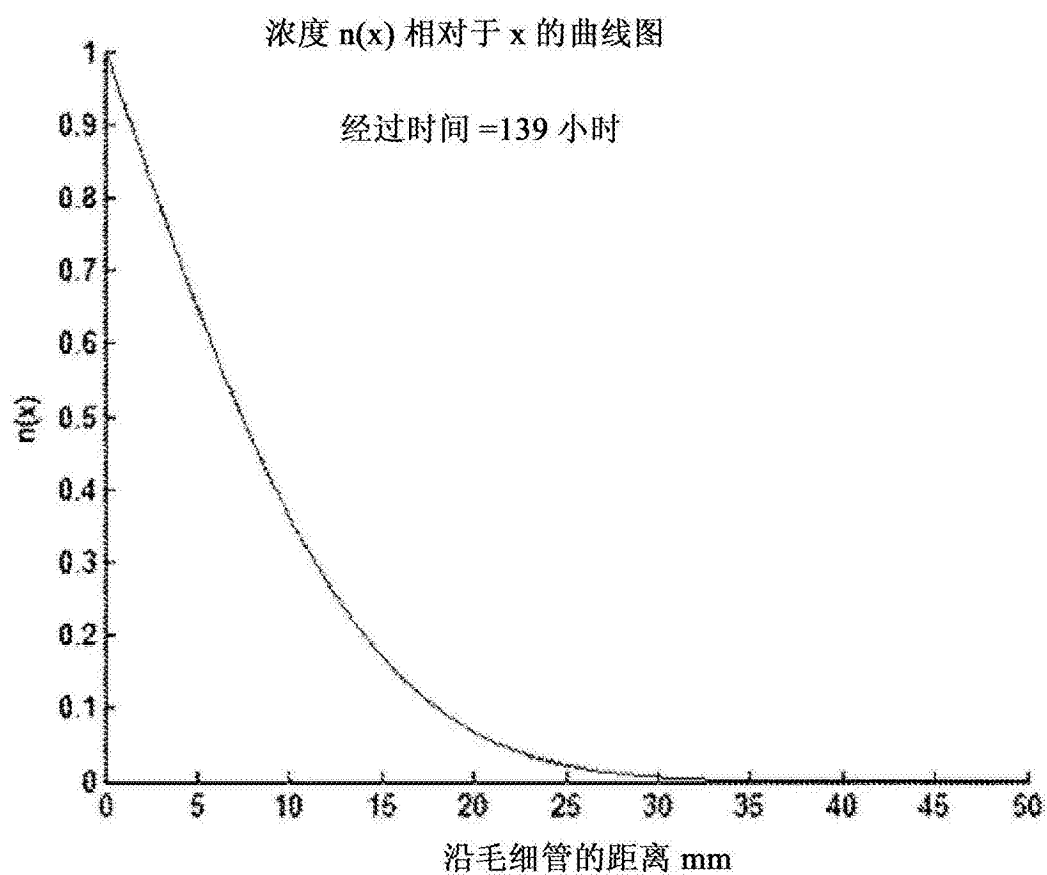


图 7