



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108603828 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201680080047.0

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(22)申请日 2016.11.29

代理人 刘红梅

(30)优先权数据

62/260,944 2015.11.30 US

62/338,074 2016.05.18 US

(51)Int.Cl.

G01N 15/14(2006.01)

G01N 21/01(2006.01)

G01N 30/90(2006.01)

G01N 30/92(2006.01)

G01N 30/95(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/064013 2016.11.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/095813 EN 2017.06.08

(71)申请人 因塔生物公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 埃里克·T·珍塔伦

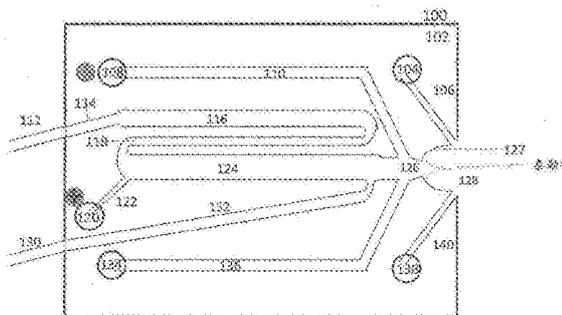
权利要求书3页 说明书14页 附图8页

(54)发明名称

用于样品表征的装置和方法

(57)摘要

提供了用于表征分析物混合物的装置和方法。本文所述的一些方法包括在从装置排出富集的分析物部分以供随后分析之前在装置上进行富集步骤。还包括进行这些富集步骤的装置。



1. 一种设备,包括:

由不透明材料构成的基底,所述基底具有一厚度和一顶表面,其中限定了具有与所述基底的厚度相等的深度的微流体分离通道,使得所述微流体分离通道限定一穿过所述基底的光学缝隙;以及

安设在所述基底的顶表面上的层,所述层的安设在所述微流体分离通道上方的部分是透明的。

2. 如权利要求1所述的设备,其中所述层为第一层,所述设备还包括:

安设在所述基底的底表面上的第二层,所述第二层的安设在所述微流体分离通道下方的部分是透明的。

3. 如权利要求1所述的设备,还包括安设在所述微流体分离通道内的分离介质。

4. 如权利要求1所述的设备,还包括安设在所述微流体分离通道内的两性电解质溶液。

5. 如权利要求1所述的设备,其中所述基底、所述微流体分离通道和所述层被共同配置成:当所述设备被成像时,光仅通过所述光学缝隙传播。

6. 如权利要求1所述的设备,其中所述层的一部分是不透明的。

7. 如权利要求1所述的设备,其中所述层的透明部分在所述微流体分离通道的整个长度上延伸。

8. 如权利要求1所述的设备,其中:

所述基底的侧表面限定一埋头表面,所述埋头表面具有与所述微流体分离通道的末端部分流体连通的孔口;

所述基底限定一储器,所述储器流体耦合至所述微流体分离通道的所述末端部分,使得当流体从所述孔口排出时,来自所述储器的流体围绕来自所述微流体分离通道的流体形成鞘溶液。

9. 如权利要求1所述的设备,其中:

所述基底还限定气体通道;

所述基底的侧表面限定一埋头表面,所述埋头表面具有与所述基底流体连通的第一孔口和由所述埋头表面限定的第二孔口,所述气体通道被配置用于输送处于从所述第一孔口排出的流体的侧面的雾化气体。

10. 如权利要求1所述的设备,其中所述基底还限定:

第一储器,其流体耦合至所述微流体分离通道的第一末端部分;

第二储器,其流体耦合至与所述第一末端部分相对的所述微流体分离通道的第二末端部分,所述设备还包括:

第一电接触,其电耦合至所述第一储器;以及

第二电接触,其电耦合至所述第二储器,使得可以经由所述第一储器和所述第二储器向所述微流体分离通道施加电场以诱导所述微流体分离通道内的电泳。

11. 如权利要求1所述的设备,其中所述微流体分离通道为色谱分离通道,并且所述基底还限定一电泳分离通道,该电泳分离通道流体耦合至所述色谱分离通道,使得可以在所述设备内进行分离的至少两个阶段。

12. 如权利要求1所述的设备,其中所述基底还限定洗脱通道,该洗脱通道流体耦合至所述微流体分离通道,所述洗脱通道被配置用于向所述微流体分离通道输送洗脱液以洗脱

结合至安设在所述微流体分离通道中的介质的分析物。

13. 如权利要求1所述的设备,其中所述基底的侧表面限定一埋头表面,所述埋头表面具有与所述微流体分离通道流体连通的孔口,所述孔口和所述埋头表面被共同配置成使得从所述孔口发散的泰勒锥被整体安设在由所述埋头表面限定的体积内。

14. 一种方法,包括:

将分析物混合物引入含有分离通道的微流体装置;

跨所述分离通道施加电场,以实现所述分析物混合物的分离;

经由所述微流体装置的透明部分对所述分析物混合物的所述分离进行成像;

从与所述分离通道流体连通的孔口排出所述分析物混合物的片段。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述分析物混合物的所述片段经由电喷雾电离排出。

16. 如权利要求14所述的方法,其中所述分析物混合物的所述片段经由电喷雾电离排出,并且所述孔口被安设在由所述微流体装置限定的凹口内,使得在所述孔口处形成的泰勒锥完全在所述凹口内。

17. 如权利要求14所述的方法,其中对所述分析物混合物的所述分离进行成像包括对整个分离通道进行成像。

18. 如权利要求14所述的方法,还包括:

照射微流体装置的表面,所述分离通道形成于所述微流体装置的不透明基底中,使得所述基底仅允许入射至所述将要成像的分离通道上的光。

19. 如权利要求14所述的方法,其中还包括:

用紫外光照射所述微流体装置;

阻挡入射至由钠钙玻璃构成的基底上的紫外光,所述基底限定所述微流体装置,使得对所述分析物混合物的所述分离进行成像包括仅对通过所述分离通道的紫外光进行成像。

20. 如权利要求14所述的方法,其中所述分离通道为第一分离通道,所述方法还包括:

在所述微流体装置的第二分离通道中富集所述分析物混合物的片段。

21. 如权利要求14所述的方法,其中:

所述分离通道为第一分离通道;并且

所述电场实现所述分析物混合物的片段的分离,所述方法还包括:

在施加所述电场以实现所述分析物混合物的所述片段的分离之前,在第二分离通道中色谱富集所述分析物混合物的所述片段。

22. 一种方法,包括:

将分析物混合物注射至含有第一分离通道的微流体装置中,所述第一分离通道含有介质,该介质被配置用于结合来自所述分析物混合物的分析物;

将洗脱液注射至所述微流体装置中,使得所述分析物的至少一片段从所述介质流通;

在所述分析物流通时,对所述第一分离通道进行成像;

当所述成像检测到所述片段被安设在所述第一分离通道与第二分离通道的交汇处时,向所述第二分离通道施加电场,使得所述片段流通至所述第二分离通道中;以及

排出所述片段的至少一部分。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述片段的所述至少一部分经由电喷雾电离排出。

24. 如权利要求22所述的方法,其中所述片段的所述至少一部分经由电喷雾电离排出,使得在孔口处形成的泰勒锥安设于由所述微流体装置限定的凹口内。

25. 如权利要求22所述的方法,还包括:

经由所述第二分离通道中的毛细管区带电泳来分离所述分析物的所述片段。

26. 如权利要求22所述的方法,还包括:

经由电泳在所述第二分离通道中分离所述分析物的所述片段;以及

在所述分析物的所述片段已被分离时,对所述第二分离通道进行成像。

27. 如权利要求22所述的方法,其中所述第二分离通道的第一末端部分与所述第一分离通道相交,所述方法还包括:

将鞘溶液注射至所述分离通道的第二末端部分中,该第二末端部分与所述分离通道的所述第一末端部分相对。

28. 如权利要求22所述的方法,其中所述第一分离通道与所述第二分离通道正交。

29. 一种设备,包括:

基底,其限定:

第一富集区,含有被配置用于结合分析物的介质;

与所述第一富集区相交的第二富集区;

凹表面;以及

由所述凹表面限定的孔口,所述孔口为朝向所述第二富集区的第一末端部分的开口;

第一电极,其电耦合至所述第二富集区的所述第一末端部分;以及

第二电极,其电耦合至与所述第一末端部分相对的所述第二富集区的第二末端部分。

30. 如权利要求29所述的设备,其中所述第一富集区与所述第二富集区正交。

31. 如权利要求29所述的设备,其中所述第一富集区被安设在所述第二富集区之前,使得样品的至少一部分从所述第一富集区流向所述第二富集区。

32. 如权利要求29所述的设备,还包括:

安设在所述基底上方的覆盖物,所述覆盖物的至少一部分是透明的。

33. 如权利要求29所述的设备,其中所述基底由钠钙玻璃构成,使得当用紫外光照射所述设备时,所述第一富集区限定一光学缝隙。

用于样品表征的装置和方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请是于2015年11月30日提交的题为“Devices, Methods, and Kits for Sample Characterization”的美国临时专利申请号62/260,944和于2016年5月18日提交的题为“Devices, Methods, and Kits for Sample Characterization”的美国临时专利申请号62/338,074的非临时申请,并且要求所述美国临时专利申请的权益,所述美国临时专利申请中的每一个的公开内容通过引用整体并入于此。

背景

[0002] 本文所述的一些实施方式涉及用于样品表征的装置和方法及其各种用途。

[0003] 根据分析物的内在质量从更复杂的分析物混合物中分离分析物组分,并提供富含该质量状态的片段组,是分析化学的关键部分。以这种方式对复杂混合物进行简化降低了下游分析的复杂性。进行两个或更多个正交的富集步骤(例如,基于不同和/或不相关的质量)可能是有利的。然而,在许多情况下,使用已知方法和/或装置进行正交富集步骤的过程比较繁琐,并且可能使分析物的稀释超出下游分析装备的灵敏度。另外,当尝试将已知的富集方法和/或装置与分析装备和/或技术相结合时,可能产生复杂情况。

[0004] 已经使用一些方法来将蛋白质样品制备技术与下游检测系统如质谱仪相结合。一种常用方法是使用液相色谱制备样品并收集用于质谱的片段(LC-MS)。这种方法具有需要将蛋白质样品消化成肽片段的缺点,产生必须进行的大量样品片段以及运行后的复杂数据重建。尽管某些形式的液相色谱如肽图反相色谱可以与质谱仪耦合,但这些已知技术局限于使用肽片段而不是完整蛋白质,这限制了其实用性。

[0005] 将样品引入质谱仪的另一种方法是电喷雾电离(ESI)。在ESI中,在毛细管或微流体装置远端处的样品和溶液的小液滴被电离以诱导质谱仪荷电板的吸引。然后液滴在该感应电场中延伸成锥形(“泰勒锥”),该锥形液滴随后将小液滴释放到质谱仪中以供分析。这通常在毛细管中完成,向ESI提供了方便的体积和大小。然而,毛细管提供的线性流动路径不允许多步骤处理。

[0006] 微流体装置已被用于进行其他工作。可通过各种已知技术生产微流体装置并且提供限定宽度的流体通道,该通道可构成设计用于进行不同流体操作的通道网络。这些装置提供比毛细管更高的控制水平和复杂性。关于ESI,已知的装置包括向外渐细的尖端和导电边缘,以试图增强这些装置中的ESI。然而,已知用于ESI的微流体装置的向外渐细使脆弱的泰勒锥结构暴露于由湍流气流引起的潜在干扰,并且产生的接触表面几何形状会仅支持有限的锥半径范围,这限制了对通过ESI引入质谱仪的体积的控制。另外,导电边缘处的水的电解可能导致气泡形成,这干扰了锥体的发展。

[0007] 蛋白质质谱的一个应用是用于在生物制品和生物仿制药物的开发和制造期间进行表征。生物制品和生物仿制药是如下的一类药物,包括例如重组蛋白、抗体、活病毒疫苗、来源于人血浆的蛋白质、基于细胞的药物、天然来源的蛋白质、抗体-药物缀合物、蛋白质-药物缀合物和其他蛋白质药物。

[0008] 监管合规性要求生物制品需要在开发和制造期间进行广泛的测试,而这对于小分

子药物来说是不必要的。这是因为,由于例如使用活体材料来生产生物制品、生物分子的更大复杂性以及制造过程的更大复杂性,生物制品的制造具有更大的复杂性。需要限定的特征包括例如电荷、功效、疏水性变化、质量和糖基化。目前这些测试是彼此独立进行的,导致生物制品的表征非常耗时且过程昂贵。

发明内容

[0009] 本文所述的一些实施方式涉及可以使得能够分析分析物混合物中的分析物的装置和方法。例如,监管机构要求对生物蛋白进行许多特定表征。本文所述的方法和装置可以适用于表征蛋白质和/或其他分析物。在一些实施方式中,本文所述的方法和装置可以涉及表征分析物混合物,所述表征包括为了将分析物混合物分离成富集的分析物片段而进行的一个或多个富集步骤。

[0010] 在一些情况下,这些分析物可以是例如聚糖、碳水化合物、DNA、RNA、完整蛋白质、经消化的蛋白质、抗体-药物缀合物、蛋白质-药物缀合物、肽、代谢物或其他生物相关分子。在一些情况下,这些分析物可以是小分子药物。在一些情况下,这些分析物可以是蛋白质混合物中的蛋白质分子,如生物蛋白药物和/或从分离自培养物或体内的细胞收集的裂解物。

[0011] 本文所述的一些实施方式可以包括第一富集步骤,其中洗脱含有来自原始分析物混合物的分析物分子子集的片段(fraction),一次洗脱一个片段;然后使这些富集的分析物片段经受另一富集步骤。在最后的富集步骤处,所述富集的分析物片段被排出以供进一步分析。

[0012] 在一些实施方式中,一个或多个所述富集步骤将会是固相分离。在一些实施方式中,一个或多个所述富集步骤将会是溶液相分离。

[0013] 在一些实施方式中,最终步骤在排放之前浓缩所述富集的分析物片段。

[0014] 在一些实施方式中,来自所述最终富集步骤的基本上所有所述富集的分析物片段都以连续流排出。在一些实施方式中,所述分析物混合物的一部分(例如,感兴趣的片段)将会经由被配置成与分析仪器(如质谱仪或被配置用于分级和/或富集所述样品的至少一部分的另一装置)相接的出口从微流体装置排出。所述分析物混合物的另一部分(例如,含有除所述感兴趣片段之外的片段)可以经由废物通道排出。

[0015] 在一些实施方式中,使用压力、电力或电离或这些的组合来进行所述排放。

[0016] 在一些实施方式中,使用电喷雾电离(ESI)进行所述排放,使其进入例如质谱仪中。在一些实施方式中,使用鞘液作为电泳分离的电解质。在一些实施方式中,提供雾化气体以将所述分析物片段还原成细喷雾。在一些实施方式中,使用其他电离方法,诸如感应耦合激光电离、快原子轰击、软激光解吸、大气压化学电离、二次离子质谱、火花电离、热电离等。

[0017] 在一些实施方式中,所述富集的片段将会沉积在表面上以供由基质辅助的激光解吸/电离、表面增强激光解吸/电离、免疫印迹等进行进一步分析。

[0018] 本文所述的一些实施方式涉及用于在所述排放富集片段之前和期间使电泳分离中的分析物可视化的装置和方法。

[0019] 本文所述的一些实施方式涉及用于在富集步骤期间使分析物可视化的装置和方法。

[0020] 本文所述的一些实施方式涉及用于使富集区之间的通道中的分析物可视化的装置和方法。

[0021] 在一些实施方式中,分析物的所述可视化可以经由光学检测来进行,如紫外光吸收、可见光吸收、荧光、傅立叶变换红外光谱、傅立叶变换近红外光谱、拉曼光谱、光学光谱等。

[0022] 本文所述的一些实施方式涉及可以使得能够进行分析物混合物的所述分析的装置,因为所述装置含有一个或多个富集区和用于排出富集的分析物片段的孔口。在一些实施方式中,这些装置包括至少一个不透射特定波长的光的层和至少一个透射该特定波长的层。所述不透射光的层的一个或多个部分可以限定所述一个或多个富集区,使得所述富集区充当光学缝隙。

[0023] 在一些实施方式中,可以通过将装置连接到自动进样器的管或毛细管而将分析物混合物装载到所述装置中。在一些实施方式中,可以将分析物混合物直接装载到所述装置上的储器中。

[0024] 在一些实施方式中,孔口是埋头的和/或被遮蔽以免受气流影响,至少一部分样品可以通过所述孔口从装置排出。在一些实施方式中,所述孔口不导电。如本文所用的,埋头应被理解为意味着基底的一部分限定含有所述孔口的凹口,而不考虑所述凹口的侧面或倒角的几何形状。类似地,埋头应被理解为包括锥口孔、圆锥形埋头孔和/或截头圆锥形埋头孔、半球形孔等。

[0025] 本文所述的一些实施方式涉及一种设备,如微流体装置,其包括由不透明材料(例如,钠钙玻璃,其对紫外光不透明)构成的基底。所述基底可以限定微流体分离通道。类似地,所述微流体分离通道可以被蚀刻或以其他方式形成于所述基底内。所述微流体分离通道的深度可以等于所述基底的厚度。类似地,所述微流体分离通道可以在所述基底的整个深度(例如,从顶部一直贯穿到底部)进行蚀刻。以这种方式,所述微流体分离通道可以限定穿过所述基底的光学缝隙。透明层(例如,顶层)可以安设在所述基底的顶表面上,例如密封所述基底的顶表面。透明层(例如,底层)也可以安设在所述基底的底表面上,使得所述微流体分离通道的顶部和底部都被密封。在一些实施方式中,所述顶层和/或所述底层的仅一部分可以是透明的。例如,所述顶层和/或所述底层可以在不透明的材料中限定一透明窗口;所述窗口可以提供通向例如所述微流体分离通道的光学通路。

[0026] 本文所述的一些实施方式涉及一种设备,如包括基底的微流体装置。所述基底可以限定一个或多个富集区或通道。例如,所述基底可以限定第一富集区,所述第一富集区含有被配置用于结合分析物的介质。这样的第一富集区可以适合于通过色谱分离分析物混合物。所述设备还可以包括电耦合至第二富集区的相对的末端部分的两个电极。这样的第二富集区可以适合于通过电泳分离分析物混合物。所述第二富集区可以与所述第一富集区相交,使得当分析物的片段在所述第一富集区中被分离、浓缩和/或富集后,其可以在所述第二富集区中被进一步分离、浓缩和/或富集。所述装置还可以包括凹孔口。所述孔口可以是所述第二富集通道的出口,并且可以安设在所述基底的埋头或以其他方式凹陷的表面上。所述设备可以被配置成经由ESI从所述孔口排出一部分分析物混合物。所述凹口可以向与ESI相关联的泰勒锥的形成提供稳定环境并且/或者可以被配置用于接受质谱仪的入口端。

[0027] 本文所述的一些实施方式涉及一种方法,其包括将分析物混合物引入含有分离通

道的微流体装置。可以跨所述分离通道施加电场以实现所述分析物混合物的分离。可以在分离期间经由所述微流体装置的透明部分对所述分析物混合物进行成像。类似地,窗口和/或光学缝隙可以提供通向所述分离通道的光学通路,使得所述整个分离通道或其一部分可以在所述分离发生时进行成像。所述分析物混合物的片段可以从与所述分离通道流体连通的孔口排出。例如,所述片段可以经由ESI排出。在一些实施方式中,所述孔口可以安设在所述微流体装置的埋头表面(countersunk surface)上,使得在由所述埋头表面限定的凹口内形成泰勒锥(Taylor cone)。

[0028] 本文所述的一些实施方式涉及一种方法,其包括将分析物注射至含有第一分离通道和第二分离通道的微流体装置中。所述第一分离通道可以含有被配置用于结合来自所述分析物混合物的分析物的介质。因此,在将所述分析物混合物注射至所述微流体装置中时,所述分析物混合物的至少一片段可以结合至所述基质和/或被阻碍而不能流过所述第一分离通道。例如,将所述分析物注射至所述微流体装置中可以在所述第一分离通道中实现色谱分离。可以将洗脱液注射至所述微流体装置中,使得所述分析物的至少一片段从所述介质流通。可以在所述分析物已流通时对所述第一分离通道进行成像。对所述第一分离通道进行成像可以包括全柱(例如,整个通道)成像和/或对所述通道的一部分成像。当所述成像检测到所述片段被安设在所述第一分离通道与所述第二分离通道的交汇处时,可以向所述第二分离通道施加电场,使得所述片段流通至所述第二分离通道。例如,在一些实施方式中,所述第一分离通道可以与所述第二分离通道正交。类似地,所述第一分离通道与所述第一分离通道可以形成T形接头。所述成像可以检测所述片段的一部分(例如,感兴趣的部分)何时处于所述接头处。施加所述电场可以使所述片段的一部分(并且任选地,不是并未处于所述接头处的所述片段的其他部分)流通至用于第二阶段分离的所述第二分离通道中。所述片段的至少一部分可以从所述微流体装置排出。

附图说明

- [0029] 图1是根据实施方式的用于自动装载样品的二维分离和ESI的装置的示意图。
- [0030] 图2是根据实施方式的具有三层的装置的示意性分解图。
- [0031] 图3是根据实施方式的穿过微流体装置的光路径的图示。
- [0032] 图4是根据实施方式的用于自动装载样品的IEF和ESI的装置的示意图。
- [0033] 图5是根据实施方式的微流体装置的示意图。
- [0034] 图6是用于分析物表征的示例性方法的流程图。
- [0035] 图7是根据实施方式的微流体装置的图示。
- [0036] 图8是根据实施方式的微流体装置的图示。

具体实施方式

[0037] 应当理解,上述的一般性描述和以下的描述仅仅是示例性和解释性的,并不限制本文所述的方法和装置。在本申请中,除非另有特殊说明,否则单数的使用包括复数。同样,除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。类似地,“包含”、“包括”并不旨在限制。

装置

图1是根据实施方式的用于自动装载样品的二维分离和ESI的装置的示意图。微流体网

络100由基底102限定。基底由与所进行的富集步骤相容的材料制成。例如,关于材料的选择考虑到化学相容性、pH稳定性、温度、在不同波长的光下的透明度、机械强度等。

[0038] 基底102可以由玻璃、石英、熔融石英、塑料、聚碳酸酯、PFTE、PDMS、硅、多氟化聚乙烯、聚甲基丙烯酸酯、环烯烃共聚物、环烯烃聚合物、聚醚醚酮和/或任何其他合适的材料制成。如果在平面基底和/或任何其他合适的材料的不同层中需要不同的性质,则可以使用材料的混合物。如果在平面基底的的不同层中需要不同的性质,则可以使用材料的混合物。

[0039] 通道106、110、114、116、118、124、122、126、132、136和140形成微流体网络100并被制造到基底102中。类似地,基底102限定通道106、110、114、116、118、124、122、126、132、136和/或140。

[0040] 可以通过诸如例如光刻蚀刻、模塑、机加工、增材(3D)打印等任何通道制造方法在基底中制造通道。

[0041] 可以通过管/导管112装载分析物混合物和外部试剂,并且可以通过管/导管130去除过量的试剂/废物。

[0042] 管112和130可以由与所进行的测定相容的任何材料制成,包括例如熔融石英、熔融石英毛细管、硅酮管材和/或PTFE管材。

[0043] 通道116和124可以用于分离和/或富集分析物和/或分析物的一部分(例如,片段)。可以使用通道116和/或124来进行色谱分离(例如,反相色谱、免疫沉淀色谱、离子交换色谱、尺寸排阻色谱、配体亲和色谱、染料亲和色谱、疏水作用色谱、亲水作用色谱、pH梯度离子交换色谱、亲和色谱、毛细管电动色谱、胶束电动色谱、高效液相色谱(HPLC)、氨基酸分析-HPLC、超高效液相色谱、肽图谱HPLC、场流分级-多角度光散射色谱)或电泳分离(例如,等电聚焦电泳、毛细管凝胶电泳、毛细管区带电泳、等速电泳、毛细管电动色谱、胶束电动色谱、流动平衡毛细管电泳、电场梯度聚焦电泳、动态场梯度聚焦电泳)。例如,可以使用用以进行第一富集步骤的材料衍生或填充所述通道116。

[0044] 可以选择安设在通道116和/或124内的材料以基于例如疏水性(反相)、免疫亲和(免疫沉淀)、亲和(功效)、尺寸(尺寸排阻色谱)、电荷(离子交换)或通过其他形式的液相色谱来捕获分析物。

[0045] 可以使用许多不同的方法将富集材料安设在通道116和/或124内。壁可以直接衍生有例如共价结合或吸附的分子,或者珠子、玻璃颗粒、溶胶-凝胶等可以进行衍生并装载到这些通道中。

[0046] 在将样品装载到通道116之后,可以通过管112和通道114引入洗涤溶液和随后的洗脱试剂。

[0047] 洗脱过程将会取决于在通道116中进行的富集方法。可以选择合适的洗脱液以洗脱所结合的分析物的片段。一些富集选项可能不需要洗脱步骤(例如,尺寸排阻色谱、电泳分离等)。

[0048] 然后洗脱液或流通液将会通过通道118流入通道124。通道124可以用于进行色谱富集步骤或电泳富集步骤。

[0049] 可以通过使用电源在储器108与储器120之间施加电场,从而在通道124中进行电泳分离。类似地,装置100可以包括与储器108和/或储器120电接触的电极。电源的电接地可以连接至质谱仪的电接地,以提供从通道124到质谱仪的电场中的连续性。

[0050] 可以在通道124中进行任何CE电泳方法——IEF、ITP、CGE、CZE等。或者,可以在通道124中进行非电泳富集方法。

[0051] 在IEF或ITP的情况下,浓缩的纯化样品带将会通过压力或电手段朝着汇合处126流通。来自储器108和134的鞘溶液(sheath solution)可以用作鞘和阴极电解液。

[0052] 鞘/阴极电解液可以是与电泳分离和质谱相容的任何碱性溶液(例如,MeOH/N₄OH/H₂O)。阳极电解液可以是任何酸性溶液(例如,磷酸10mM)。

[0053] 或者,可以将电场反转,并且可以将阴极电解液(NaOH)装载到储器120中,并且可以将阳极电解液用作储器108和134中的鞘溶液。

[0054] 汇合处126是所富集的分析物片段与鞘溶液混合的地方。随着通道124中的分析物片段流通,溶液将会通过汇合处126被推出至孔口128。

[0055] 孔口128可以安设在由基底102的表面127限定的凹口内。例如,表面127可以是埋头ESI表面。例如,如图1中所示,通过孔108电接地的富集分析物溶液可以形成从孔口128发散的泰勒锥,该孔口整体安设在由表面127限定的凹口内。孔口128和/或表面127可以朝着质谱仪入口定向,该质谱仪可以相对于孔108具有电压电势差。当喷雾离开锥体结构前往质谱仪时,其在离开基底102之前,在侧面可以伴有通过通道106和140提供的雾化气体。雾化气体可以是任何惰性气体或非反应性气体(例如,氩气、氮气等)。

[0056] 另外,使用鞘液和/或雾化气体可以允许使用离子耗尽步骤作为最后的“装置上”步骤。鞘液允许在ESI之前的IEF电荷测定浓缩步骤期间补充离子电势损失,而雾化提供在细雾中的样品以供脱机分析(off line analysis)。

[0057] 通过在表面127上生成泰勒锥,锥体产生于稳定的袋或凹口中并且被保护免受干扰气流的影响。此外,埋头孔口周围的锥形几何形状具有自然扩张的接触表面,该表面将会容纳更宽范围的泰勒锥径向横截面,从而允许进入质谱仪的更宽的流速范围。

[0058] 孔口128可以定位在质谱仪的入口端附近。在一些情况下,表面127可以被配置成使得质谱仪的入口端可以安设在由表面127限定的凹口内。

[0059] 图2是根据实施方式的具有三层的装置212的示意性分解图。图2A示出了根据实施方式的装置212的顶层202。图2B示出了根据实施方式的装置212的中间层206。图2C示出了根据实施方式的装置212的底层210。图2D示出了根据实施方式的组装的装置212。三个层202、206、210中的每一个均可以由与装置212旨在进行的测定相容的任何材料制成。

[0060] 在一些实施方式中,层202将会由对特定波长或波长范围的光而言透明的材料制成。如本文所用的,“透明(transparent)”应理解为意指材料具有的透射率足以允许材料一侧上具有特定波长或波长范围的光的量被另一侧上的检测器量化。在一些情况下,具有30%、50%、80%、95%或100%的透射率的材料是透明的。在一些实施方式中,感兴趣的波长范围将会包括中等紫外范围(例如,200nm-300nm),并且诸如例如玻璃、石英、熔融石英和UV-透明塑料(如聚碳酸酯、多氟化聚乙烯、聚甲基丙烯酸酯、环烯烃聚合物、环烯烃共聚物和其他UV-透明材料)等材料可以用作透明材料。在一些实施方式中,感兴趣的光谱将会扩展超过可见光谱(例如,200-900nm)。

[0061] 在层202中制造通孔204以允许具有来自装置外部的通向下层(例如,层208)中的通道网络的压力和电接口。

[0062] 图2B示出了含有通道网络208的装置212的内部中间层206。通道网络被设计成与

制造在顶层202中的通孔接口。通道网络208含有入口和出口管/管道209和用于排出富集的分析物片段的孔口205以及可视富集区207。富集区207被制造成使得其深度是层206的整个厚度。在其他实施方式中,区207可以小于层206的整个厚度。

[0063] 在一些实施方式中,层206将会由对特定波长或波长范围的光而言不透明和/或不透过的材料制成。如本文所用的,“不透明”应理解为意指材料具有的透射率不足以允许材料一侧上的光的量被另一侧上的检测器量化,并且除了在通道网络中的区与层206的整个厚度一样深的区域中之外,其将会有效地阻挡这种光。

[0064] 图2C示出了装置212的底层210。底层210可以是例如固体基底。在一些实施方式中,底层210可以由与层202具有相同透射率的材料制成。

[0065] 图2D示出了根据实施方式的组装而成的包括顶层202、中间层206和底层210的装置212。在组装装置210之后,入口和出口管209、储器204和孔口205仍然可以进入。在一些实施方式中,整个顶层202和/或整个底层210可以是透明的。在其他实施方式中,顶层202的一部分和/或底层210的一部分可以是不透明的,而顶层202和/或底层210的另一部分是透明的。例如,当装置212被组装时,顶层210和/或底层210可以限定与富集区207的至少一部分对准的光学窗口。

[0066] 图3是根据实施方式的通过微流体装置302的光路径的图示。图3A示出了微流体装置302的顶视图。图3B示出了定位在光源306与检测器308之间的微流体装置302。检测器308被定位成测量穿过装置302的光。虽然未在图3中示出,但是微流体装置302可以具有与如图1和图2中所描述的类似的通道结构,然而为了便于参考,未示出通道结构。在一些实施方式中,微流体装置302的顶表面的一部分是不透明的,并且完全或基本上遮蔽从光源306投射的光,使其无法到达检测器308。不透明顶表面的一部分基本上防止光在那些不期望检测样品性质的部分处透射穿过装置。例如,由于通道304横贯非透明层的整个厚度,因此在一些实施方式中,微流体装置302在一个或多个通道区域304上并非是不透明的(例如,允许一些光穿过)。

[0067] 在一些实施方式中,该透明通道区域304可以是富集区,其中可以使用光学检测来检测分析物、监测富集的进展和/或在所富集的分析物片段被排出装置时对其进行监测。在一些实施方式中,穿过透明通道304的光量的变化将会用于测量分析物片段在该通道中时的吸光度。因此,在一些实施方式中,通道区域304限定光学缝隙,使得定位于微流体装置302的一侧上的光源306仅通过透明通道区域304来有效地照射检测器308。以这种方式,可以为检测器308有效地阻挡杂散光(例如,不穿过透明通道区域和/或样品的光),这可以减少噪声并改善检测器308观察透明通道区域304内的样品的能力。在一些实施方式中,透明通道区域304将会处于两个富集区之间,并且可以用于在分析物片段从上游富集区洗脱时对其进行检测。

方法

[0068] 图6图示了根据实施方式的分析物混合物富集的方法。该方法包括在步骤20处将分析物混合物装载和/或引入到微流体装置上。微流体装置可以类似于上文参考图1-图3所描述微流体装置。在一些实施方式中,分析物混合物可以是例如聚糖、碳水化合物、DNA、RNA、完整蛋白质、经消化的蛋白质、肽、代谢物、疫苗、病毒和小分子。在一些实施方式中,分析物混合物可以是蛋白质的混合物,如培养细胞的裂解物、基于细胞的治疗剂,或者来源于

肿瘤或其他组织的细胞、包括生物药物在内的重组蛋白、来源于血液的细胞、灌注物或来自任何其他来源的蛋白质混合物。分析物混合物可以直接装载到装置上,或者可以装载到自动进样器上以对多种混合物进行系列分析。

[0069] 微流体装置可以包括第一分离通道和/或富集区。在一些实施方式中,第一分离通道和/或富集区可以被配置用于色谱分离。例如,第一分离通道和/或富集区可以含有被配置用于结合来自分析物混合物的分析物和/或以其他方式实现色谱分离的介质。在步骤21处,可以进行第一富集;例如,可以在第一分离通道和/或富集区中进行色谱分离。在一些实施方式,如其中分析物混合物是蛋白质混合物的实施方式中,步骤21处的第一富集可以简化蛋白质混合物。步骤21处的第一富集可以基于分析物的任何可辨别的质量。

[0070] 然后在步骤22处洗脱该富集的分析物片段。例如,可以将洗脱液注入微流体装置中以使所富集的分析物片段从安设在第一分离通道和/或富集区内的介质流通。在一些实施方式中,可以对所富集的分析物片段的富集和/或流通进行成像。例如,如上文所讨论的,第一分离通道和/或富集区可以限定光学缝隙。可以将光投射到微流体装置上,并且检测器可以检测穿过第一分离通道和/或富集区的光。可以经由吸光度和/或荧光成像技术来检测样品或其一部分。

[0071] 微流体装置可以包括第二分离通道和/或富集区。在一些实施方式中,第二分离通道和/或富集区可以被配置用于电泳分离。在步骤23处,可以对例如洗脱物进行第二富集。例如,可以施加跨第二分离通道和/或富集区的电场和/或电势。

[0072] 在一些实施方式中,在步骤23处,当分析物混合物的片段被安设在第一分离通道和/或富集区与第二分离通道和/或富集区的交汇处时,可以开始第二富集。例如,可以对第一分离通道和/或富集区进行监测(例如,成像),并且当感兴趣的片段到达交汇处时,可以施加电势和/或电场。

[0073] 在一些实施方式中,步骤23处的第二富集可以提供基于电荷特征(电荷同种型)而富集的片段。这样的富集可以包括例如凝胶等电聚焦、伴随流通的等电聚焦、伴随全柱成像的等电聚焦、离子交换色谱、pH梯度交换色谱、等速电泳、毛细管区带电泳、毛细管凝胶电泳或例如基于电荷的其他富集技术。

[0074] 虽然步骤21处的第一富集已被描述为色谱富集,并且步骤23处的第二富集已被描述为电泳,但应理解,任何合适的富集均可以以任何合适的顺序进行。例如,步骤21处的第一富集和步骤23处的第二富集可以均为色谱或均为电泳。作为另一示例,步骤21处的第一富集可以是电泳,而步骤23处的第二富集可以是色谱。

[0075] 在一些实施方式中,一种或多种富集可以提供基于疏水性变化如氧化而富集的片段。这样的富集可以包括例如反相色谱、疏水作用色谱、亲水作用色谱或例如基于疏水性的其他富集技术。

[0076] 在一些实施方式中,一种或多种富集可能会提供基于以下各项而富集的片段:翻译后修饰、糖形(包括半乳糖基化、岩藻糖基化、唾液酸化、甘露糖衍生物和其他糖基化)以及糖化、氧化、还原、磷酸化、磺化、二硫键形成、脱酰胺化、酰化、聚乙二醇化、切割、抗体-药物缀合(ADC)、蛋白质-药物缀合、C-末端赖氨酸加工、其他天然和非天然存在的翻译后修饰以及在蛋白质翻译之后引入的其他化学和结构的修饰等。这样的富集可以包括例如结合测定等。

[0077] 在一些实施方式中,一种或多种富集可以提供基于疏水性变化如氧化而富集的片段。这样的富集可以包括例如反相色谱、疏水作用色谱、亲水作用色谱或基于疏水性的其他富集技术。

[0078] 在一些实施方式中,一种或多种富集可以提供基于一级氨基酸序列(如由加工期间的突变、氨基酸置换等产生的一级氨基酸序列)而富集的片段。这样的富集可以包括例如通过电荷同种型、疏水性变化或可区分一级氨基酸序列差异的其他富集技术来进行分离。

[0079] 在一些实施方式中,一种或多种富集可以提供基于功效而富集的片段。这样的富集可以包括例如生物测定、酶抑制测定、酶活化测定、竞争测定、荧光偏振测定、闪烁邻近测定或基于功效的其他富集技术等。

[0080] 在一些实施方式中,一种或多种富集可以提供基于亲和力而富集的片段。这样的富集可以包括例如溶液相结合靶标、结合基于珠子的靶标、表面结合靶标、免疫沉淀、蛋白A结合、蛋白G结合等。

[0081] 在一些实施方式中,一种或多种富集可以提供基于质量或大小而富集的片段。这样的富集可以包括例如聚丙烯酰胺凝胶电泳、毛细管凝胶电泳、尺寸排阻色谱、凝胶渗透色谱或基于质量的其他富集技术。

[0082] 在一些实施方式中,分析物混合物在从装置排出之前将会经历超过两次富集。

[0083] 在步骤24处,富集的分析物片段可以从装置排出。在一些实施方式中,富集的分析物片段可以经由IEF排出。步骤24处的排出所富集的分析物片段可以在排出分析物片段之前将其浓缩。

[0084] 在一些实施方式中,在步骤24处,使用电离技术如电喷雾电离、大气压化学电离等排出分析物片段。

[0085] 在一些实施方式中,在步骤24处,使用电力或流体动力来排出分析物片段。

[0086] 在一些实施方式中,在步骤24处,富集的蛋白质片段以与质谱仪耦合的方式从装置排出。

[0087] 可以例如通过飞行时间质谱、四极质谱、离子阱或轨道阱质谱、飞行距离质谱、傅里叶变换离子回旋共振、共振质量测量和纳米机械质谱来测量从微流体装置排出的分析物(例如,生物制品或生物仿制药)的质量。

[0088] 在一些实施方式中,使用pI标志物来映射可视化IEF通道(例如,第一分离通道和/或富集区和/或第二分离通道和/或富集区)中的pI范围。在一些实施方式中,可以通过分析物在下游质谱数据中的存在使用pI标志物或两性电解质来确定分析物的pI。

[0089] 在一些实施方式中,可以在流通和ESI期间监测IEF。以这种方式,质谱数据可以与IEF中的峰相关联,这可以维持和/或改善峰分辨率。

[0090] 在一些实施方式中,可以使用压力源使分析物混合物和/或其一部分在微流体装置内流通。在一些实施方式中,利用流体静压力实现流通。在一些实施方式中,流通是化学固定。在一些实施方式中,流通是电动流通。

[0091] 图7是根据实施方式的微流体装置的图示。微流体网络800安设在基底802中并且/或者由基底802限定。基底由与所进行的富集步骤相容的材料制成。例如,当选择材料时,可以关注化学相容性、pH稳定性、温度、在各种波长的光下的透明度、机械强度等。

[0092] 基底802可以由玻璃、石英、熔融石英、塑料、聚碳酸酯、PFTE、PDMS、硅、多氟化聚乙

烯、聚甲基丙烯酸酯、环烯烃共聚物、环烯烃聚合物、聚醚醚酮和/或任何其他合适的材料制成。如果在平面基底的不同层中需要不同的性质,则可以使用材料的混合物。

[0093] 通道806、808、810、811、817、814、812形成通道网络并在基底802中被制造(例如,由基底802限定)。

[0094] 可以通过诸如光刻蚀刻、模塑、机加工、增材(3D)打印等任何通道制造方法在基底中制造通道。

[0095] 可以通过管804装载分析物混合物和外部试剂,并且可以通过管810和818去除过量的试剂/废物。

[0096] 管804、810和/或818可以由与所进行的测定相容的任何材料制成,包括熔融石英、熔融石英毛细管、硅酮管材、PTFE管材等。

[0097] 通道806和814可以被指定为分离/富集区。可以使用通道806和/或814中的任一个进行色谱分离(反相色谱、免疫沉淀色谱、离子交换色谱、尺寸排阻色谱、配体亲和色谱、染料亲和色谱、疏水作用色谱、亲和色谱、毛细管电动色谱、胶束电动色谱等)或电泳分离(等电聚焦电泳、毛细管凝胶电泳、毛细管区带电泳、等速电泳、毛细管电动色谱、胶束电动色谱、流动平衡毛细管电泳、电场梯度聚焦电泳、动态场梯度聚焦电泳等)。例如,通道806可以被衍生或填充有用以进行由通道806中较暗的圆圈表示的第一富集步骤的材料。

[0098] 可以选择安设在通道806中的材料以基于疏水性(反相)、亲和(功效)、尺寸(尺寸排阻色谱)、电荷(离子交换)、免疫亲和(免疫沉淀)、蛋白质-蛋白质相互作用、DNA-蛋白质相互作用、适体-碱基捕获、小分子碱基捕获或通过其他形式的液相色谱等来捕获分析物。

[0099] 可以使用许多不同方法将富集材料安设在通道806和/或814内。壁可以直接衍生有共价结合或吸附的分子,或者珠子、玻璃颗粒、溶胶-凝胶等可以衍生并装载到这些通道中,或者通道可以填充有筛分材料,诸如线性聚合物溶液(如线性聚丙烯酰胺(LPA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚环氧乙烷(PEO)、葡聚糖等)、交联聚合物溶液(如聚丙烯酰胺等)、用于液相色谱的基质或其他材料。

[0100] 根据所进行的具体测定,可以添加化学反应性溶液。在一些情况下,可以在将材料装载到通道806(或通道814)中之后,通过添加将会吸附或共价结合至所装载的材料或者可以将反应性元素交联至该材料的分子来进行材料的衍生化。例如,可以将包覆有抗体结合分子如蛋白A、蛋白G、环氧树脂等的材料安设在通道806中。随后用抗体溶液漂洗将会留下包覆有抗体且能够参与免疫亲和捕获的材料。在一些情况下,可以将抗体与靶分析物或裂解物混合,使得抗体在包覆至材料上之前可以结合自由溶液中的其靶标。

[0101] 在将富集材料装载到装置上之后,经由管804将样品装载到通道806中。随后,可以将洗涤溶液和洗脱试剂通过管804引入通道806。

[0102] 在一些情况下,将会添加检测试剂以结合所捕获的材料。许多标记试剂均可用,其可以通过附接至氨基酸侧链如赖氨酸、半胱氨酸和其他氨基酸部分来将检测部分(如荧光团、发色团或其他检测分子)共价附接至多肽末端处的靶蛋白。共价结合的检测部分允许通过荧光激发、发色测定或其他间接手段来检测蛋白质。在一些情况下,靶蛋白可以保持未标记,并通过在220nm、280nm或该蛋白质将会吸收光的任何其他波长处的天然吸光度,或天然荧光进行检测。在一些情况下,将会使用非共价结合的发荧光标记物、发色标记物、荧光标记物或发色团标记物(如**SYPRO®** ruby、考马斯蓝等)来检测该蛋白质。

[0103] 在一些情况下,检测试剂将会直接添加至通道814以帮助检测。

[0104] 洗脱过程将会取决于在通道806中所进行的富集方法。该洗脱过程将会被选择用于洗脱所结合的分析物的至少一片段。在一些情况下,这可以使用加热与十二烷基硫酸钠(SDS)的组合或者其他去污剂、甘氨酸、尿素或将会诱导所捕获分析物的释放的任何其他方法来完成。一些富集选项可能不需要直接的洗脱步骤(例如,尺寸排阻色谱)。在一些情况下,洗脱之后将会是变性。

[0105] 然后,洗脱液将会流过通道808进入下一分离/富集区——通道814。通道814可以用于进行色谱或电泳的富集步骤。

[0106] 可以通过使用电源在储器812与储器816之间施加电场而在通道814中进行电泳分离。当来自通道806的洗脱物穿过通道808和814的交汇处时,可以启用电场,从而将分析物装载到通道814中。在一些情况下,如在蛋白质分析物被带负电荷的去污剂如SDS饱和的标准凝胶电泳模式中,分析物将会带负电荷。然而,通道814的极性可以容易地逆转以适应系统,例如其中蛋白质分析物被带正电荷的去污剂如十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)等饱和的系统。在其他情况下,蛋白质分析物可以包覆有中性洗涤剂,或未包覆洗涤剂(如在天然凝胶电泳中)。在这种情况下,将会基于蛋白质靶标在所选缓冲液体系中的预期电荷来选择极性,使得蛋白质分析物将会迁移到通道814中。

[0107] 可以在通道814中进行任何CE电泳方法——IEF、ITP、CGE、CZE等。或者,可以在通道中进行非电泳富集方法。

[0108] 可以通过全柱成像、部分柱成像和/或通过单点检测来观察通道814中的分析物。

[0109] 在一些情况下,通道806、814或两者中的富集材料可以被移除并且补充新鲜材料,使得该装置可以用于另一分析物样品。

[0110] 在一些情况下,如图7的通道设计可以在装置上重复多次,使得可以并行分析多于一个分析物样品。

实施例

[0111] 根据以下实施例可以进一步理解实施方式的各个方面,这些实施例不应被解释为以任何方式进行限制。

实施例1-在质谱(MS)之前于芯片上表征蛋白质电荷

[0112] 对于本实施例,图4中所示的通道网络使用标准光刻蚀刻技术由钠钙玻璃板制成,该玻璃对280nm光具有非常低的透射率。富集通道418的深度与玻璃层402的厚度相同,即富集通道418从该玻璃板402的顶部贯穿至底部。装置400可以由安设在装置400的一侧上的光源进行照射并且由安设在装置400的对侧上的检测器进行成像。由于基底402是不透明的,而富集通道418限定了光学缝隙,因此基底402可以阻挡不通过富集通道418的光,从而阻挡杂散光并改善成像过程的分辨率。

[0113] 玻璃层402夹在对280nm光透射(例如,对其透明)的两块熔融石英板之间。如图2中所示,顶板含有用于仪器和用户与通道网络相接的通孔,而底板是实心的。将3块板在520°C下粘合30分钟。入口和出口管材由切割的毛细管(100 μ m内径,polymicro)制成,且粘合至通道网络。

[0114] 装置安装在仪器上,该仪器含有氮气源、加热器、正压泵(例如,Parker,T5-1IC-03-1EEP)、终止于两个铂-铱电极(例如,Sigma-Aldrich,357383)的电泳电源(Gamm High

Voltage, MC30)、UV光源(例如,LED, qphotonics, UVTOP280)、CCD相机(例如, ThorLabs, 340UV-GE)和用于将样品装载到装置上的自动进样器。电源与质谱仪共享一个共同的接地。该仪器通过软件(例如, labView)进行控制。

[0115] 将蛋白质样品与两性电解质pH梯度和pI标志物预先混合,随后置入小瓶中并装载到自动进样器上。该混合物经由入口412从自动进样器连续地装载到微流体装置400上,穿过富集通道418并且通过出口434离开装置前往废物通道430。

[0116] 将鞘流体/阴极电解液流体(50% MeOH, N_4OH/H_2O)装载到两个阴极电解液孔404、436上,将阳极电解液(10mM H_3PO_4)装载到阳极电解液孔426上,并将加热氮气源外接至两个气体孔408、440。

[0117] 在装载所有试剂后,通过将电极连接至阳极电解液孔426和阴极电解液孔404、436来施加从阳极电解液孔426到阴极电解液孔404、436的+600V/cm电场,从而启动等电聚焦。UV光源对准富集通道418下方,并且相机置于富集通道418上方以测量穿过富集通道418的光,从而借助聚焦蛋白的吸光度来检测聚焦蛋白。由钠钙玻璃构成的玻璃板402用于为相机阻挡任何杂散光,因此不通过富集通道418的光被阻止到达相机,提高了测量的灵敏度。

[0118] 可以在IEF期间连续和/或周期性地捕获聚焦蛋白的图像。当聚焦完成时,将会从入口412施加低压,使pH梯度朝着孔口424移动。此时可以维持电场以维持高分辨率IEF分离。在ESI过程期间继续对富集通道418进行成像可用于确定每种蛋白质从孔口424排出时的pI。

[0119] 当富集的蛋白质片段从富集通道418移动至汇合处420中时,其将会与鞘流体混合,该鞘流体可以经由鞘流体/阴极电解液流体通道406、438从阴极电解液孔404、436流向汇合处420。将富集的蛋白质片段与鞘流体混合可以将该蛋白质片段放入与质谱相容的溶液中,并使聚焦蛋白质恢复电荷(IEF使蛋白质变成无电荷状态),从而改善电离。

[0120] 然后,富集的蛋白质片段继续前往孔口424,孔口424可以由玻璃板402的埋头表面422限定。富集的蛋白质片段一旦被捕获在鞘流体孔地面(sheath fluid well ground)与质谱仪负极之间的电场中就可以产生泰勒锥。

[0121] 当溶液继续从富集通道418推进泰勒锥时,流体的小液滴将会从泰勒锥排出并飞向质谱仪入口。氮气(例如,在150°C下)可以从气体孔408、440向下流过气体通道410、432并且形成在泰勒锥侧面的氮气射流,该氮气射流可以在从泰勒锥发散的液滴离开微流体装置之前将其转化成细雾,这可以有助于质谱仪中的检测。调节来自入口412的压力可以根据需要调节泰勒锥大小以改善质谱仪中的检测。

实施例2-反相→IEF→MS

[0122] 实施例2可以类似于实施例1,但参考图1进行描述。通道116可以是装载有用C18进行衍生化的溶胶-凝胶的第一富集区。在装载蛋白质后,可以将一定体积的洗脱液(具有IEF两性电解质和标准物的MeCN/ H_2O)装载到通道116中以洗脱溶胶凝胶上捕获的疏水性最差的蛋白质。将洗脱物引导至通道124,该通道124可以是第二富集区,其中如实施例1中所述进行IEF、UV吸光度监测和最终的ESI。一旦第一洗脱物的ESI完成,使用一定体积的更高浓度的MeCN来洗脱疏水性第二差的蛋白质片段。

实施例3-功效→IEF→MS

[0123] 实施例3可以类似于实施例2,但可以将生物药物靶标衍生的珠子装载到通道116

中并用于捕获蛋白质。通过经由溶液相靶标(竞争)、盐、pH等的洗脱来表征反应的亲和力。

实施例4-反相->毛细管区带电泳->MS

[0124] 实施例4可以类似于实施例2,但是参考图5进行描述。蛋白质混合物可以通过入口521装载并且穿过富集区510,富集区510可以含有用C18进行衍生化的珠子以供进行反相色谱。在装载期间,流体穿过区510,通过观察区域511并离开出口522前往废物通道。观察区域510横贯由钠钙玻璃制成的内层,该内层对280nm UV光是不透明的,而顶层和底层由熔融石英制成,对280nm光是透明的。

[0125] 280nm光源定位在观察区域511下方并且CCD检测器放置在观察区域511上方。

[0126] 20%MeCN/H₂O的溶液通过入口521装载,通过富集区510。该溶液将会洗脱出富集了混合物中疏水性最差的蛋白质的片段。当所富集的蛋白质片段从富集区510移动到出口522时,监测观察区域511的富集蛋白质片段在280nm处的吸光度。当该片段定位于富集区510与富集区515的交汇处时,打开电源,从而在储器514中的正极与储器504处的地面之间产生电场。通过切换电源的极性可以容易地反转该极性。一旦存在电场,所富集的蛋白质片段将会从富集区515向下迁移,从而通过毛细管区带电泳来分离蛋白质。所分离的蛋白质将会与鞘电解质溶液在汇合处516处混合,并在表面518上形成泰勒锥。雾化氮气管线在端口508和528处连接到装置,并且移动通过通道512和530,从而在来自电喷雾的材料经由孔口520离开装置时处于其侧面。

[0127] 或者,可以使用流体动力学压力将富集的蛋白质片段装载到富集区515中。

实施例5-免疫沉淀->蛋白质裂解物的毛细管凝胶电泳

[0128] 在本实施例中,由环烯烃共聚物制造由图7中的布局表示的微流体通道层。类似地,微流体装置800的基底802限定通道网络。对于许多应用来说,例如,如果采用荧光检测,则可以使用单一材料制造微流体装置800,只要该材料将会透射检测分析物所需的光的波长范围。

[0129] 将蛋白A包覆的珠子装载到通道806中。用针对感兴趣的靶标产生的抗体(其将会结合至蛋白A珠子)溶液漂洗这些珠子。为了减少干扰分析物检测的抗体脱落,随后使用市售的交联剂(如庚二酰亚胺酸二甲酯(DMP)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS3)等)使抗体共价交联至珠子。在免疫沉淀之后,准备珠子并将其装载到通道806中,可以经由管804装载裂解物分析物样品。在给予分析物足够的时间以被固定的抗体捕获之后,洗涤出未结合的蛋白质并通过管822将其清除至废物通道。

[0130] 接下来,将蛋白质从抗体珠洗脱,由此可以对其进行分析。通过装载十二烷基硫酸钠(SDS)溶液并加热至50℃持续10分钟来完成洗脱。一旦释放,洗脱的分析物朝着通道808与通道814的交汇处流过通道808。当分析物块到达通道808与通道814的交汇处时,打开在储器812处的负极与储器816处的正极之间的电场,从而使带负电荷的蛋白质迁移通过通道814中的葡聚糖线性聚合物溶液,通道814已装载有荧光蛋白染料**SYPRO®** ruby。

[0131] 在CGE期间,可以使用全柱成像在通道814中将荧光标记的靶蛋白可视化。类似地,可以在用280nm光激发**SYPRO®** ruby染料并且通过检测器测量618nm处的发射光时,对整个通道814进行成像。

实施例6-无质谱仪接口的微流体设计的变化

[0132] 在一些情况下,具有差别在于质谱仪接口的存在与否的两种微流体层设计将会是

有利的。一旦分析物被表征,就可以在没有质谱数据的情况下进行证实性表征。通过在几乎相同的微流体设计中进行证实性表征,当识别出异常时,将测定转移回具有用于质量鉴定的质谱仪接口的芯片将会是简单的。这可以消除否则需要进行的显示质谱数据中进行分析的证实性数据中的异常的工作。

[0133] 作为示例,图8示出了类似于图4中所示的微流体装置400但没有孔口424和埋头表面422的微流体设计。分析物仍然通过入口904和通道906引入芯片前往富集通道908,但在分析之后,样品将会通过出口通道910冲洗出,而不是在孔口处进行电喷雾电离。该设计可以运行用于一般操作,然后在需要质量鉴定时,可以在图4中所示的微流体装置400上进行相同的富集,从而确保在图8的微流体装置900上看到分析物变体的识别。

[0134] 出于说明和描述的目的,已经呈现了本发明的特定实施方式的前述描述。它们并非旨在穷举或将本发明限制于所公开的确切形式,而是显然根据上述教导可以进行许多修改和变化。虽然已经将各个实施方式描述为具有特定特征和/或组分的组合,但其他实施方式可能具有来自任何适当的实施方式的任何特征和/或组分的组合。选择并描述实施方式以便最好地解释本发明的原理及其实际应用,从而使得本领域的其他技术人员能够最佳地利用本发明以及具有适合于预期特定用途的各种修改的各种实施方式。旨在使本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

[0135] 在上述方法和/或示意图指示以某种顺序进行的某些事件和/或流程模式的情况下,可以修改某些事件和/或流程模式的排序。另外,在可能的情况下,某些事件可以在并行过程中同时进行,也可以顺序进行。虽然已经具体示出和描述了实施方式,但应理解,可以进行形式和细节上的各种改变。

[0136] 本文引用的所有专利、专利申请、出版物和参考文献均明确地通过引用而并入,其程度如同每个单独的出版物或专利申请被特别地和单独地指出通过引用并入。

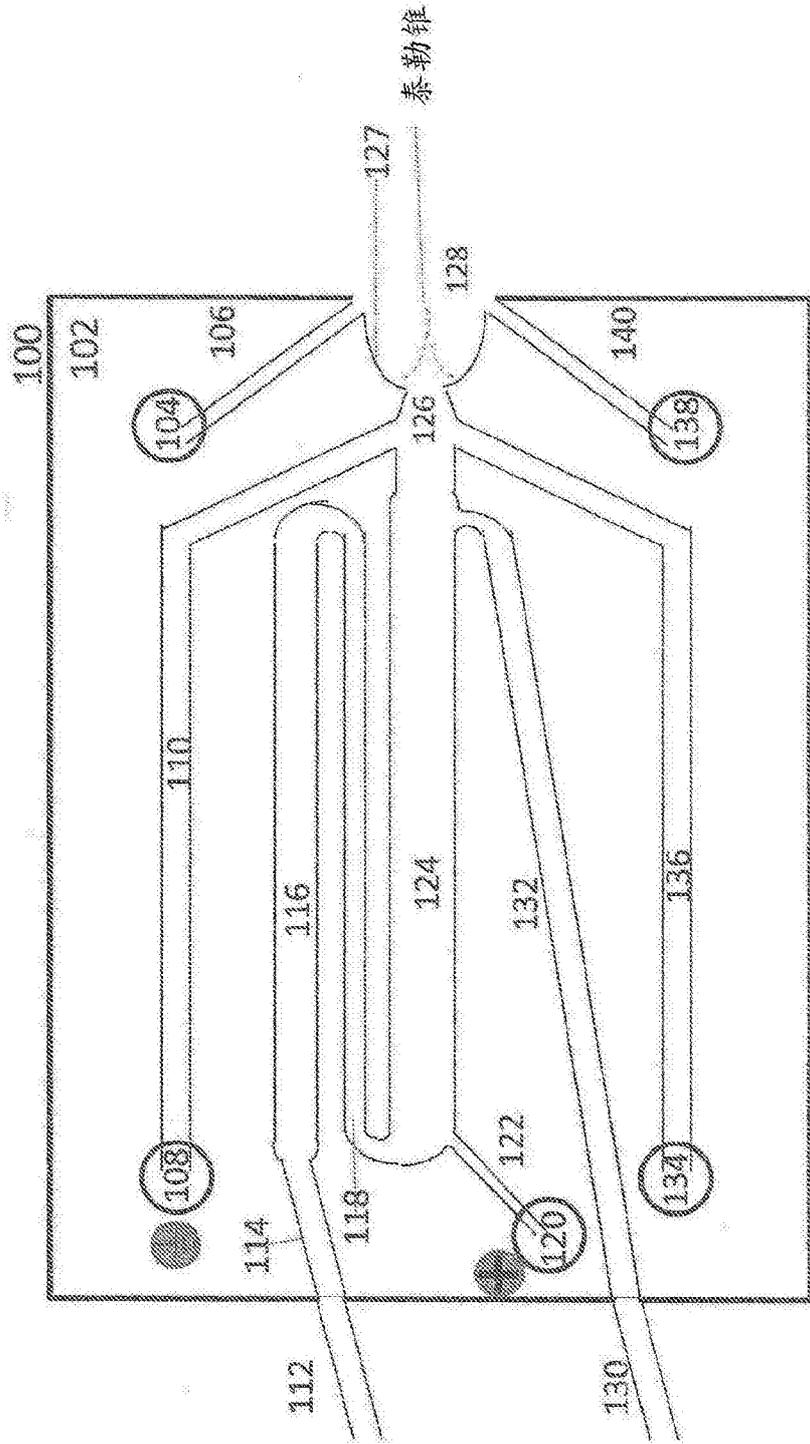


图1

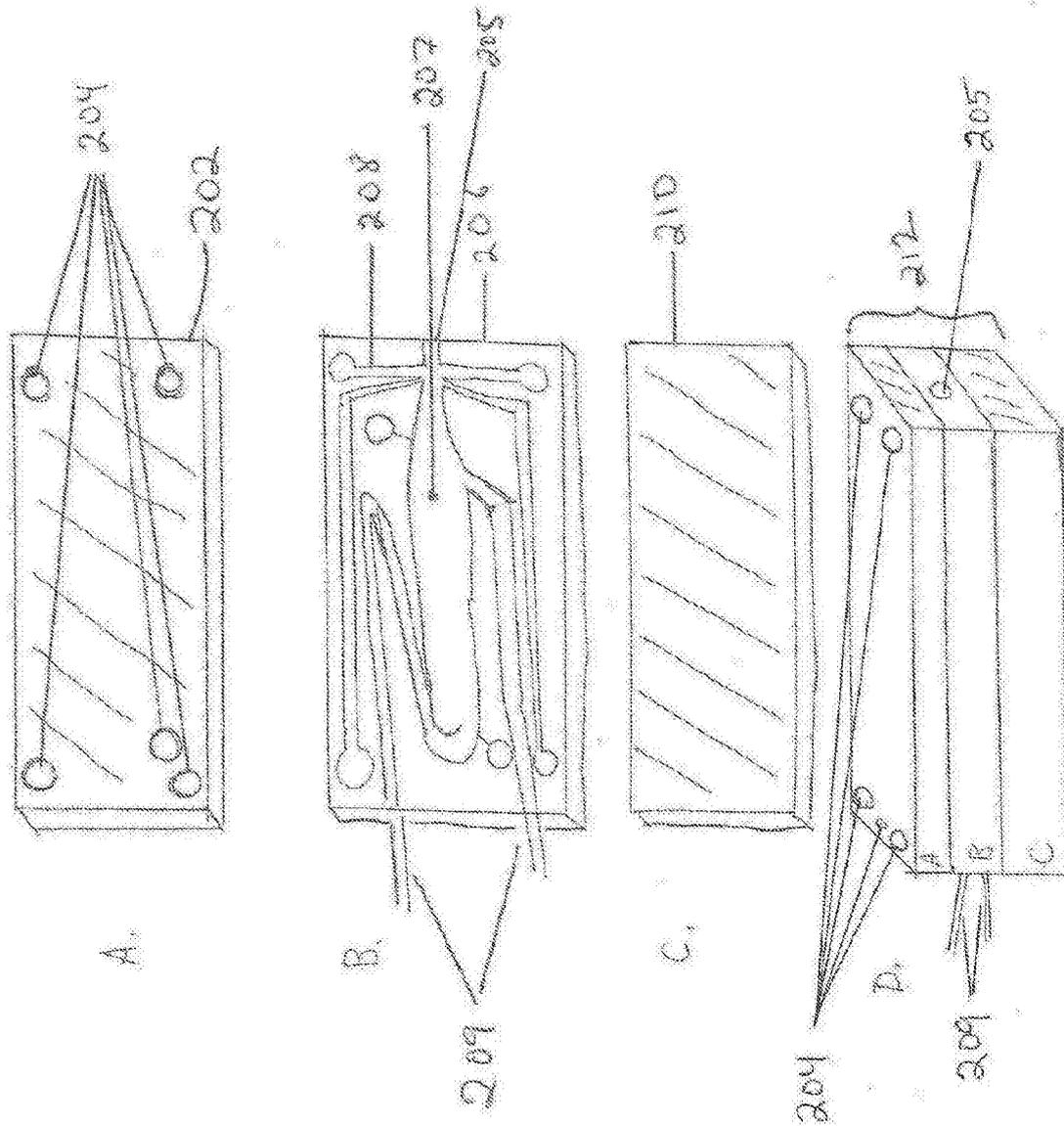


图2

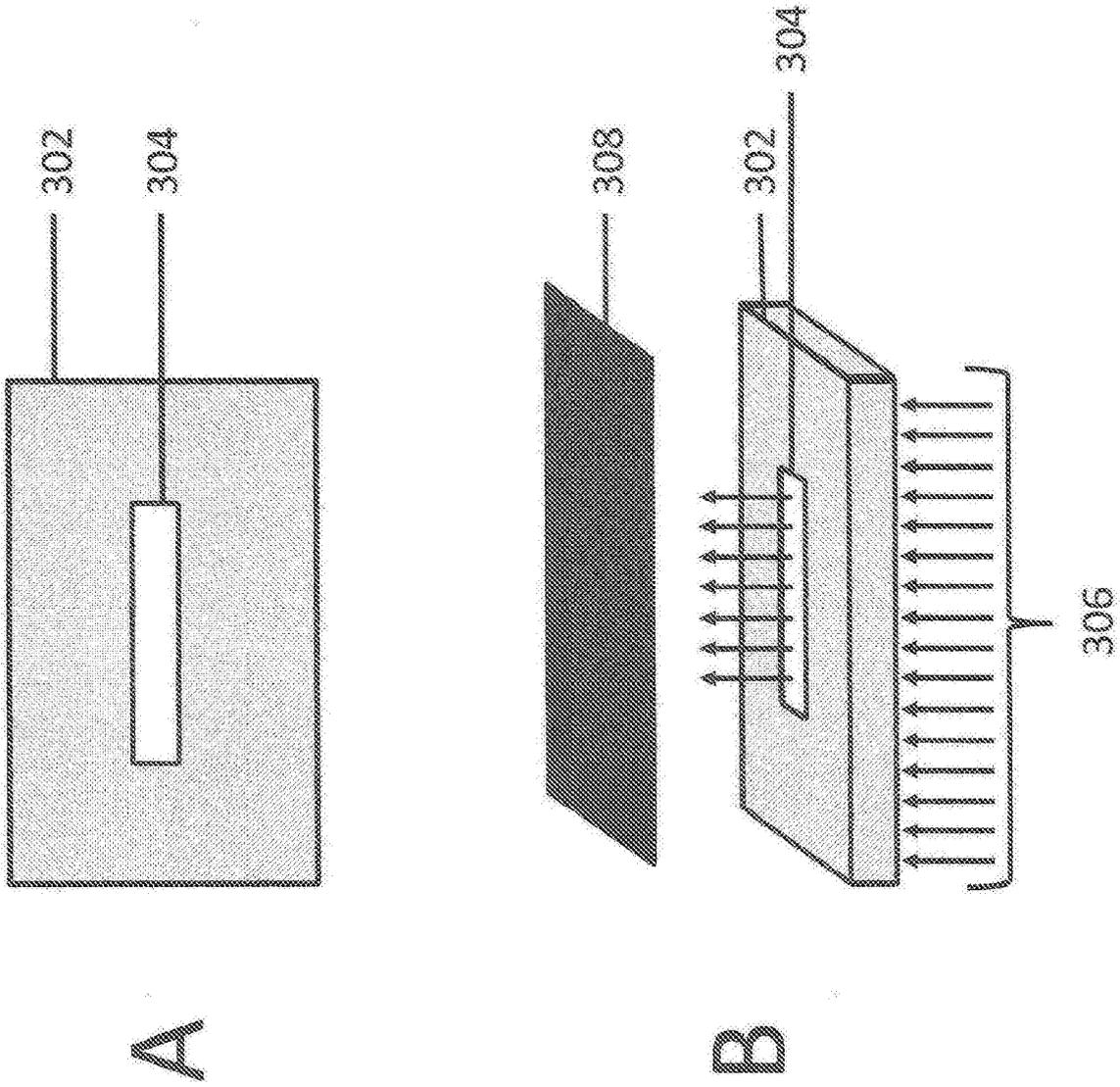


图3

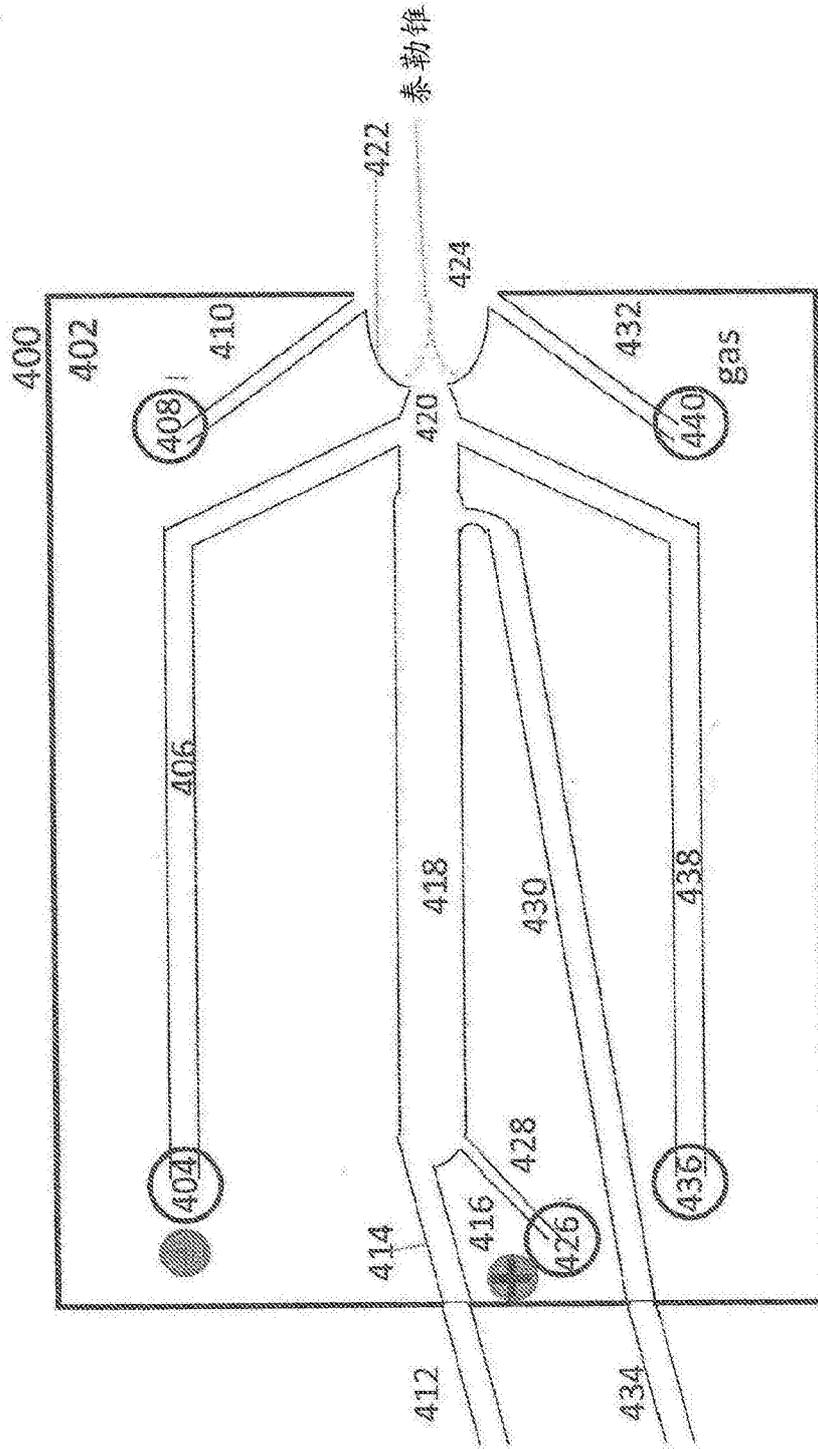


图4

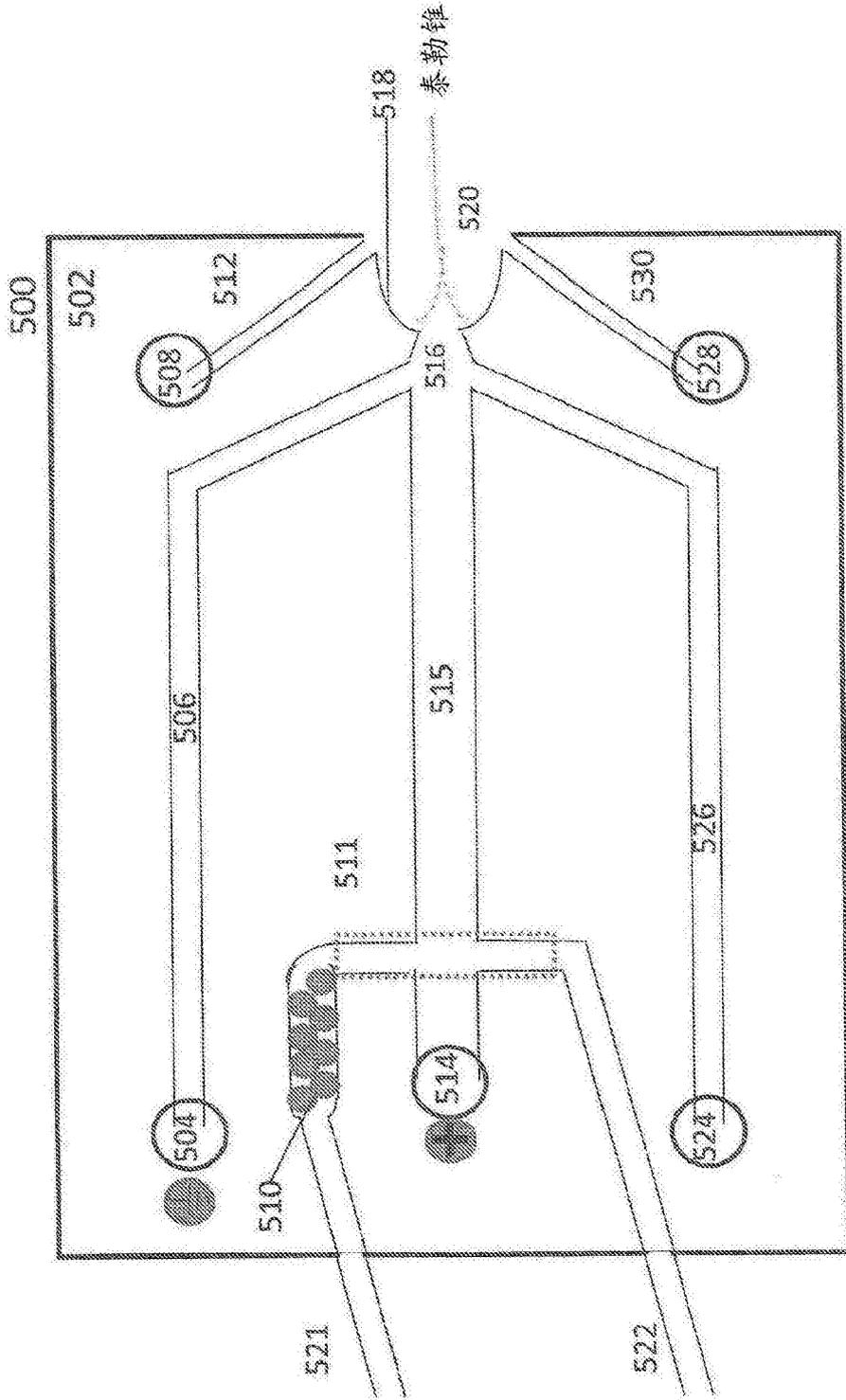


图5

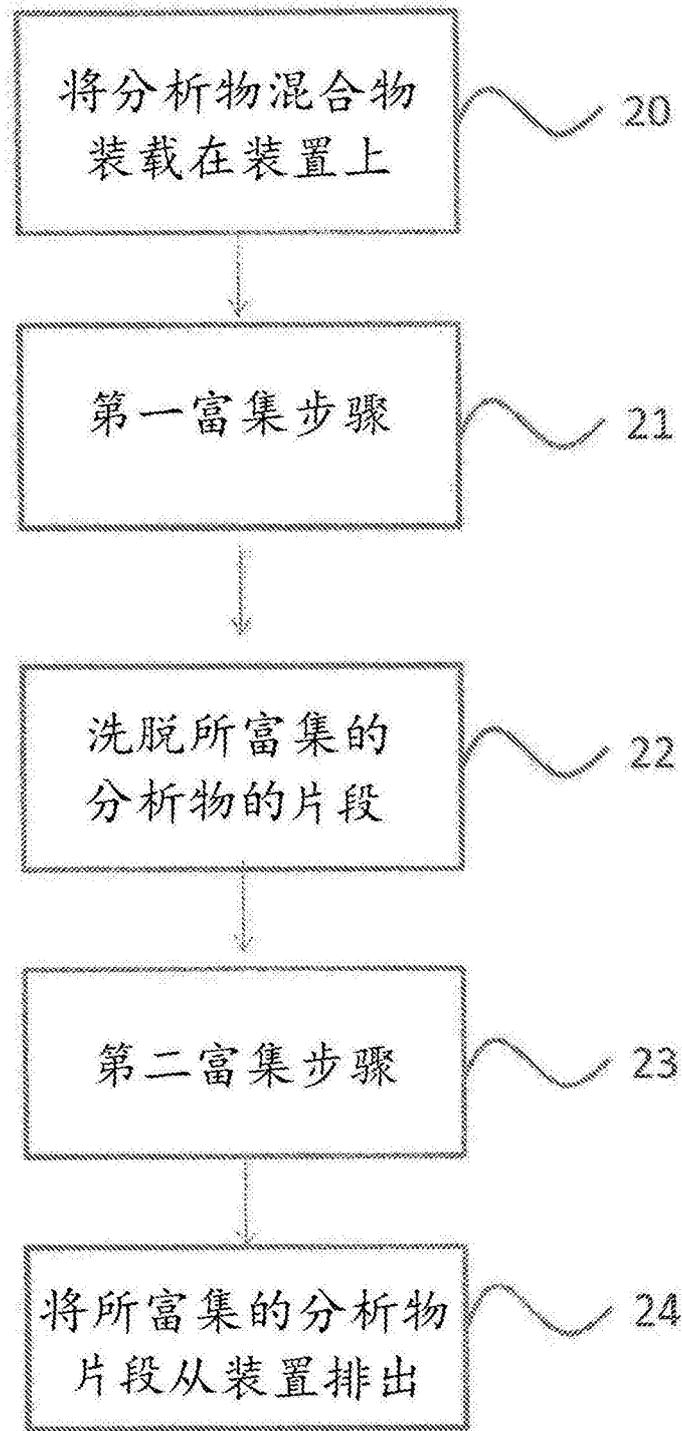


图6

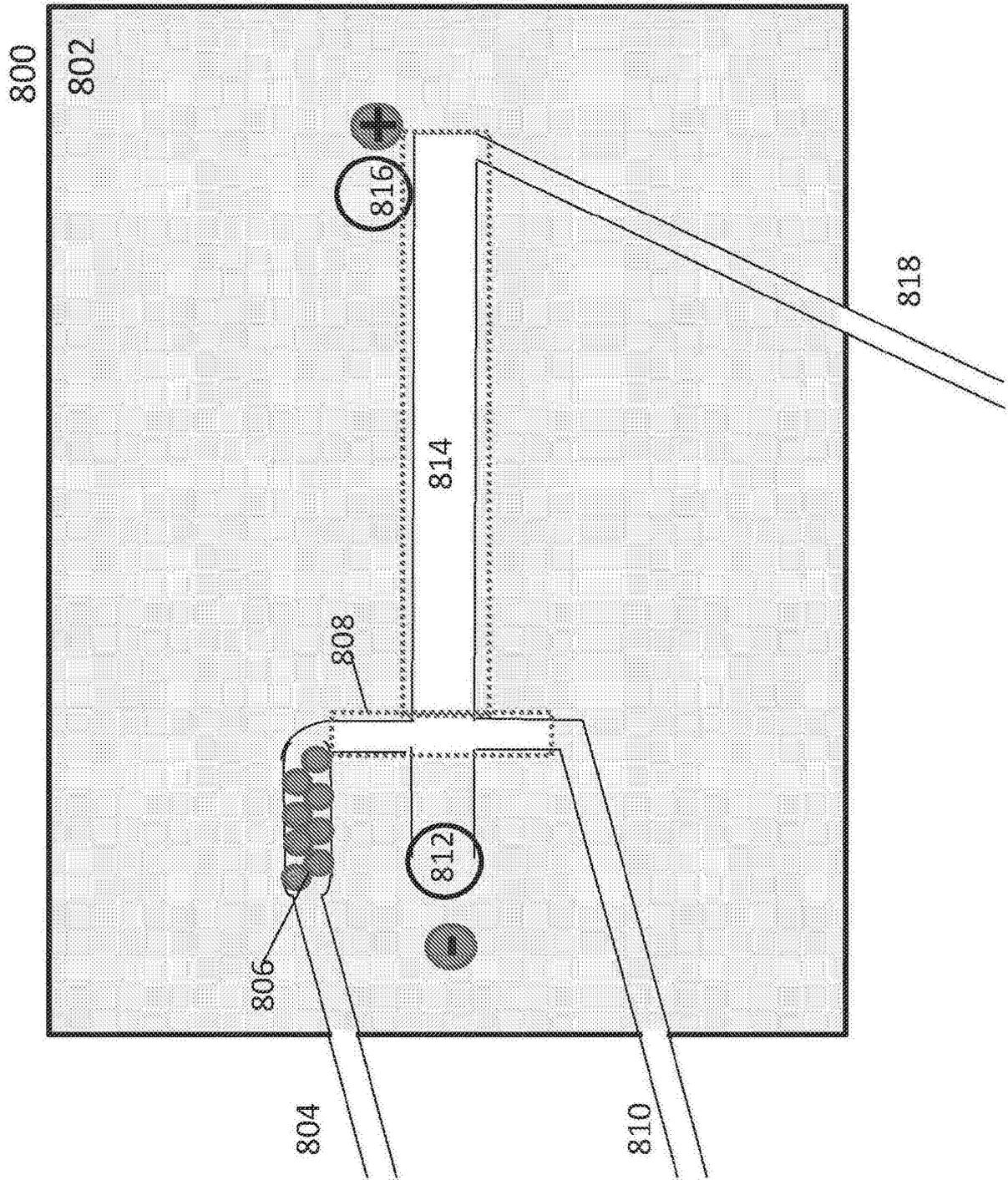


图7

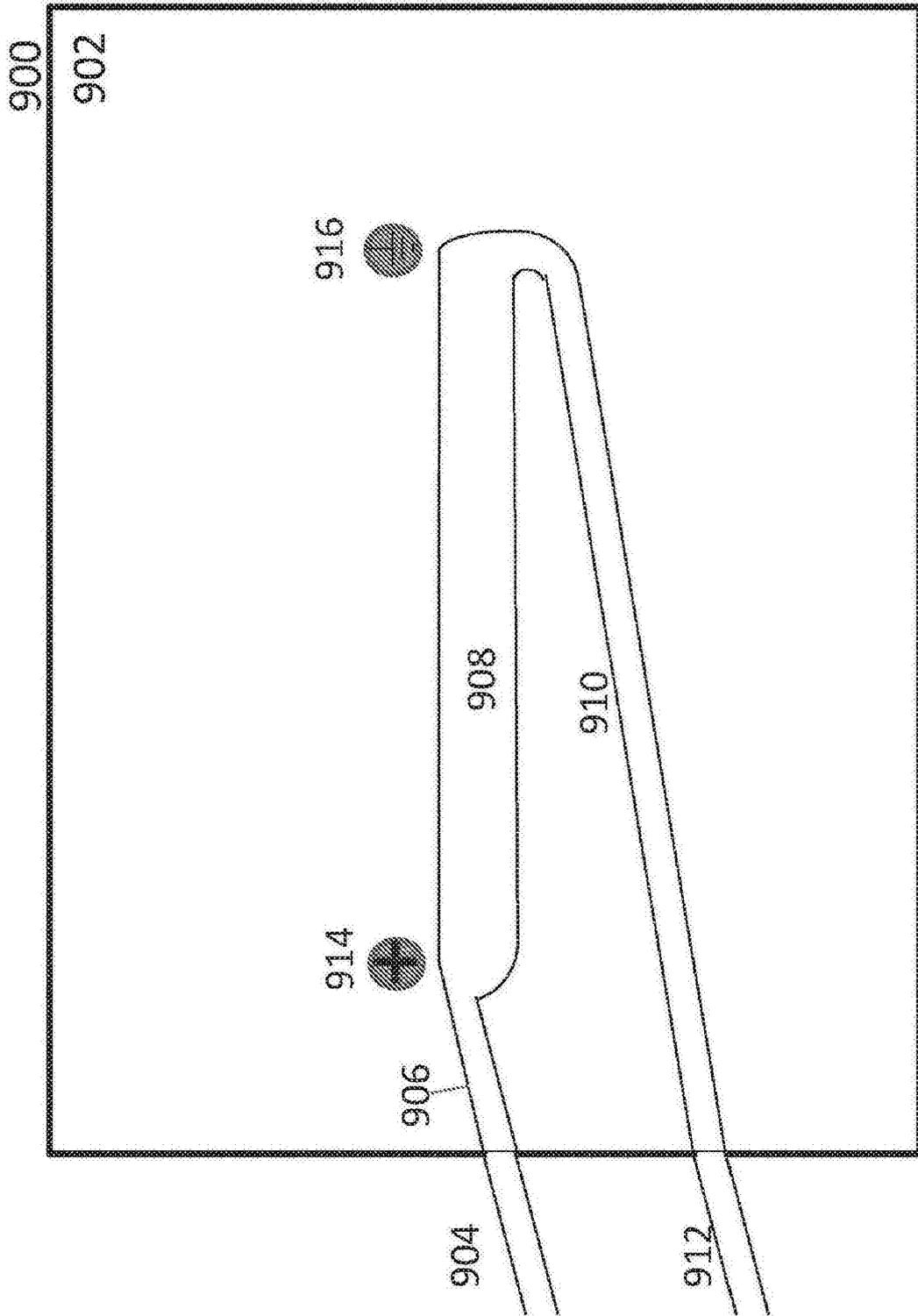


图8