

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 5 月 24 日 (24.05.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/090652 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 30/06 (2006.01) **G01N 30/02** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/092561

(22) 国际申请日: 2017 年 7 月 12 日 (12.07.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201611043531.4 2016 年 11 月 21 日 (21.11.2016) CN

(71) 申请人: 中国科学院大连化学物理研究所 (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。

(72) 发明人: 张丽华 (ZHANG, Lihua); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。袁辉明 (YUAN, Huiming); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。戴忠鹏 (DAI, Zhongpeng); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。杨开广 (YANG, Kaiguang); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。张玉奎 (ZHANG, Yukui); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。

(74) 代理人: 沈阳科苑专利商标代理有限公司 (SHENYANG PATENT & TRADEMARK AGENCY ACADEMIA SINICA); 中国辽宁省沈阳市和平区三好街 24 号, Liaoning 110004 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) Title: HIGH-THROUGHPUT BODY FLUID PROTEIN SAMPLE PRETREATMENT APPARATUS AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种高通量体液蛋白质样品预处理装置及其应用

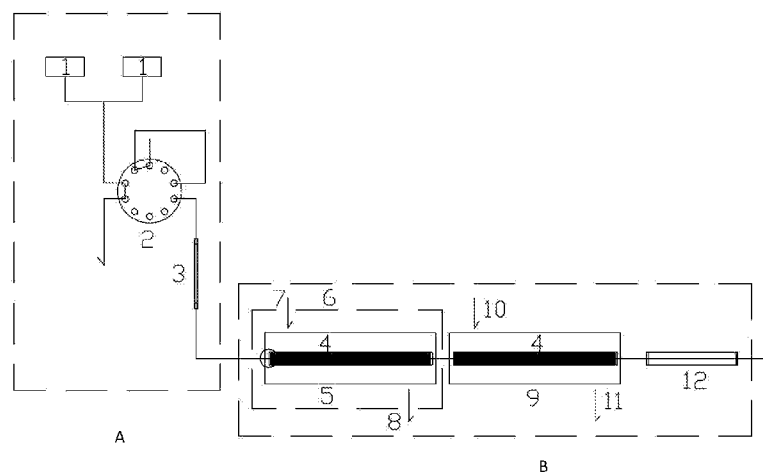


图1

(57) Abstract: A high-throughput body fluid protein sample pretreatment apparatus. The apparatus is a system integrating high-abundance protein removal from body fluids (plasma, serum, and urine), and medium- and low-abundance protein online denaturation and reduction, desalting, and on-line enzymolysis, and comprises: a high-abundance body fluid protein removal antibody column (3), a cluster type high temperature denaturation and reduction device, a cluster-type solvent displacer, and an immobilized enzyme reactor (12). High-abundance proteins are first removed from a body fluid protein sample by means of the antibody column (3); then the eluted medium- and low-abundance proteins are then subjected to online and rapid denaturation and reduction by the cluster-type high-temperature denaturation and reduction device; the denaturing agent and the reducing agent are removed by means of the cluster-type solvent displacer; finally, online enzymolysis is conducted by the immobilized enzyme reactor (12), and peptides generated by means of enzymolysis can be tested by means of mass spectrometry. The high-throughput body fluid protein sample pretreatment apparatus integrates complex sample pretreatment processes for body fluid proteins.



BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 一种高通量体液蛋白质样品预处理装置, 是一种集体液(血浆, 血清, 尿液)高丰度蛋白质去除, 中低丰度蛋白质在线变性和还原、除盐以及在线酶解的系统, 包括: 体液高丰度蛋白质去除抗体柱(3), 集束式高温变性和还原器, 集束式溶剂置换器以及固定化酶反应器(12)。体液蛋白质样品首先通过抗体柱(3)去除高丰度蛋白质, 然后洗脱下来的中低丰度蛋白质再通过集束式高温变性和还原器实现在线、快速变性和还原, 通过集束式溶剂置换器将变性剂和还原剂去除, 最后通过固定化酶反应器(12)在线酶解, 酶解产生的肽段可以通过质谱进行检测。这种高通量体液蛋白质样品预处理装置将体液蛋白质的复杂样品预处理过程进行了集成化。

一种高通量体液蛋白质样品预处理装置及其应用

技术领域

本涉及一种高通量体液蛋白质样品预处理装置，是一种集体液高丰度蛋白质去除，中低丰度蛋白质在线变性和还原、除盐以及蛋白质酶解的样品预处理系统。

5 背景技术

由于体液（血浆、血清以及尿液等）中的蛋白质可以提供大量与生理、病理密切相关的信息，因此体液蛋白质组研究已成为揭示疾病的发病机制、实现早期诊断、分型及个体化治疗等的重要手段。

10 由于体液中蛋白质的来源广泛（各种细胞、组织和器官）、种类和数量繁多（数万种以上）、丰度动态范围宽（超过 10 个数量级），因此，首要解决的问题就是减少体液中高丰度蛋白质对低丰度蛋白质检测的干扰。

此外，临床提供的可开展基础研究的体液样品量非常有限。目前体液蛋白质组样品的处理通常采用离线多步的方式，实现蛋白质的变性、还原、烷基化、酶解和除盐。不仅费时费力，而且会引起蛋白质样品的损失和污染，进而影响定量分析的准确度、15 灵敏度和分析通量。因此亟需发展高效的体液蛋白质组样品预处理新方法。

针对传统样品预处理方法存在的问题，我们发展了一种集体液高丰度蛋白质去除，中低丰度蛋白在线变性、还原、除盐以及在线酶解的样品预处理系统。该系统可以实现高通量、低损失的体液中低丰度蛋白质样品预处理，在蛋白质组学研究中具有很好的应用前景。

20 发明内容

为了解决上述问题，本发明的目的在于提供一种集蛋白质变性、还原、除盐以及在线酶解于一体的样品预处理系统。该系统可以直接处理体液蛋白质，不需要复杂和繁琐的手工操作，同时整个处理过程保持高度的连续性和高通量性。

为了实现该目的，本发明的技术方案是：

25 1、采用2根以上中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质的传输载体，并固定于变性和还原反应腔体中，通过液相色谱泵或蠕动泵将高浓度变性剂和还原剂输送至变性和还原反应腔体，并与蛋白质充分混合，在温控系统作用下加热并完成变性还原反应，其中变性剂的种类可以为盐酸胍或尿素，浓度为4-8M，蛋白质还原剂的种类可以为二硫苏糖醇、硫醇、三(2-羧乙基)膦，浓度为5-100 mM，液相色谱泵或蠕动泵的流量范围0.1mL/min-5mL/min，温控装置的加热温度范围60-95℃；

30 2、采用2根以上中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质传输载体，并固定于缓冲液置换腔体中，通过液相色谱泵或蠕动泵将低浓度弱碱性缓冲溶液输送至缓冲液置换腔体，使蛋白质溶剂与交换液发生置换，从而达到蛋白质除盐的目的，其中低浓度碱性缓冲溶液可以为碳酸氢铵或醋酸铵溶液，浓度范围为10-100mM，pH范围为7.5-8.5，液相色谱泵或蠕动泵的流量范围0.1mL/min-5mL/min；

3、酶反应器的基质材料为10-30 μm粒径的硅胶颗粒材料；蛋白酶通过共价键合附的方式固定在材料表面，所述酶为胰蛋白酶，酶液浓度范围为10-50 mg/mL；

40 4、将集束式高温变性和还原器，溶剂置换器和酶反应器依次串联构成集束式蛋白质样品预处理装置，具体为高温变性和还原器上的中空纤维膜的物料流出端与溶剂置换器上的中空纤维膜的物料流入端相连通；溶剂置换器上的中空纤维膜的物料流出端与酶反应器的物料入口相连；

5、将体液高丰度蛋白质去除抗体柱的入口端与液相色谱系统相连，从抗体柱上洗脱下来的中低丰度蛋白质直接进入集束式蛋白质样品预处理装置，产物由酶反应器的物料出口流出，中低丰度蛋白质通过酶反应器被迅速切割成多肽，实现中低丰度蛋

白质到多肽的快速转化。

6、中低丰度蛋白质酶解产生的多肽可以通过质谱直接检测或通过液质联用系统进行分析。

本发明具有如下优点：

- 5 1、体液蛋白质样品手工操作步骤减少，从而样品损失、污染的可能性也将降低，分析通量也大大提高。
- 2、系统集成化、自动化程度高。
- 3、可以与分离鉴定技术在线联用，为实现高通量的体液蛋白质分析提供技术支撑。

10 附图说明

图 1、体液高通量蛋白质样品预处理系统装置图，包括体液高丰度蛋白质去除系统(A)和集束式蛋白质样品预处理装置(B)；其中(1)：液相色谱泵；(2)：十通阀；(3)高丰度蛋白质去除抗体柱；(4)集束式中空纤维膜；(5)变性与还原反应腔体；(6)温控装置；(7)变性剂与还原剂入口；(8)：变性剂与还原剂出口；(9)置换腔体；(10)弱碱性缓冲溶液入口；(11)弱碱性缓冲溶液出口；(12)：酶反应器。

图 2、样品预处理装置处理转铁蛋白的质谱图。

图 3、样品预处理装置与液质联用系统分析人血浆低丰度蛋白质， a：抗体柱分离人血清高、低丰度蛋白质的色谱图； b：经样品预处理装置后，酶解产物的液相色谱-质谱图。

20 图 4、样品预处理装置与液质联用系统分析人尿液低丰度蛋白质液相色谱-质谱分析图。

图 5、样品预处理装置与液质联用系统分析人血清低丰度蛋白质液相色谱-质谱分析图。

具体实施方式

25 实施例 1

采用 5 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质的传输载体，并固定于变性和还原反应腔体中制备高温变性还原反应器；采用 5 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质传输载体，并固定于缓冲液置换腔体，制备溶剂置换器；采用 10 μm 粒径的硅胶颗粒为基质材料制备酶反应器，将集束式高温变性和还原器，溶剂置换器和酶反应器依次串联构成集束式蛋白质样品预处理装置，以转铁蛋白为样品考察集束式蛋白质样品预处理装置（如图 1 中 B 部分）的性能。将 100 μg (0.5mg/mL) 转铁蛋白以 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ 将转铁蛋白推入高温变性和还原器中，其中温度为 90℃，变性和还原剂为终浓度 6 M 的盐酸胍和终浓度 50 mM 的二硫苏糖醇，变性后的蛋白质样品通入溶剂置换器，交换液为终浓度 50 mM 碳酸氢铵 (pH 8.0)，在强制对流作用力下，高浓度的变性剂和还原剂得以去除；最后蛋白质样品通过硅胶基质固定酶反应器 (2.0 mm i. d×50 mm)，在室温下实现在线酶解，酶解产生的肽段通过纳升级液相色谱-质谱进行检测（如图 2 所示），从图中可以看出转铁蛋白完全转化成肽段，序列覆盖率为 76%。

实施例 2

40 采用 50 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质的传输载体，并固定于变性和还原反应腔体中制备高温变性还原反应器；采用 50 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质传输载体，并固定于缓冲液置换腔体，制备溶剂置换器；采用 20 μm 粒径的硅胶颗粒为基质材料制备酶反应器，将集束式高温变性和还原器，溶剂置换器和酶反应器依次串联构成集束式蛋白质样品预处理装置。将高丰度蛋白质去除抗体柱与集束式蛋白质样品预处理系统集成，构建了高通量体液蛋白质样品预处理系统（如图 1 所

示), 以人血浆为样品, 分析人血浆低丰度蛋白质组分。操作步骤如下: 人血浆样品首先通过抗体柱去除高丰度蛋白质(如图 3a 所示), 收集的中低丰度蛋白质组分通入该装置(操作过程同实施例 1), 酶解产生的多肽通过 C18 预柱捕集, 然后进行液质分析, 如图 3b 所示。

5 实施例 3

采用 100 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质的传输载体, 并固定于变性和还原反应腔体中制备高温变性还原反应器; 采用 50 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质传输载体, 并固定于缓冲液置换腔体, 制备溶剂置换器; 采用 30 μm 粒径的硅胶颗粒为基质材料制备酶反应器, 将集束式高温变性和还原器, 溶剂置换器和酶反应器依次串联构成集束式蛋白质样品预处理装置。将高丰度蛋白质去除抗体柱与集束式蛋白质样品预处理系统集成, 构建了高通量体液蛋白质样品预处理系统。以人尿液为样品, 分析人尿液低丰度蛋白质组分。操作步骤如下: 人尿液样品首先通过抗体柱去除高丰度蛋白质, 收集的中低丰度蛋白质组分通入该装置, 以 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 将中低丰度蛋白推入高温变性和还原器中, 其中温度为 75°C, 变性和还原剂为终浓度 8 M 尿素和终浓度 50 mM 硫醇; 变性后的蛋白质样品通入溶剂置换器, 交换液为终浓度 80 mM 碳酸氢铵 (pH 7.5) (操作过程同实施例 1), 酶解产生的多肽通过 C18 预柱捕集, 然后进行液质分析, 如图 4 所示。

实施例 4

采用 80 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质的传输载体, 并固定于变性和还原反应腔体中制备高温变性还原反应器; 采用 100 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质传输载体, 并固定于缓冲液置换腔体, 制备溶剂置换器; 采用 20 μm 粒径的硅胶颗粒为基质材料制备酶反应器, 将集束式高温变性和还原器, 溶剂置换器和酶反应器依次串联构成集束式蛋白质样品预处理装置。将高丰度蛋白质去除抗体柱与集束式蛋白质样品预处理系统集成, 构建了高通量体液蛋白质样品预处理系统。以人血清为样品, 分析人尿液低丰度蛋白质组分。操作步骤如下: 人血清样品首先通过抗体柱去除高丰度蛋白质, 收集的中低丰度蛋白质组分通入该装置, 以 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 将中低丰度蛋白推入高温变性和还原器中, 其中温度为 85°C, 变性和还原剂为终浓度 4 M 尿素和终浓度 100 mM 三(2-羧乙基)磷; 变性后的蛋白质样品通入溶剂置换器, 交换液为终浓度 80 mM 碳酸氢铵 (pH 8.5), 其他操作过程同实施例 1, 酶解产生的多肽通过 C18 预柱捕集, 然后进行液质分析, 如图 5 所示。

权 利 要 求 书

1、一种高通量体液蛋白质样品预处理装置，包括：依次串连体液高丰度蛋白质去除系统（A）和集束式蛋白质样品预处理装置（B）；

其特征在于：

- 5 集束式蛋白质样品预处理装置（B）包括依次串连的集束式高温变性和还原器、集束式溶剂置换器和酶反应器；

所述集束式高温变性和还原器包括 2 根以上管状中空纤维膜和变性和还原反应腔体；将 2 根以上根中空纤维膜集束在聚四氟管中，聚四氟管二端用环氧胶固定于变性和还原反应腔体内，以集束式中空纤维膜为蛋白质传输载体，集束式中空纤维膜两
10 端穿过变性和还原反应腔体侧壁面伸出腔体外，并于变性和还原反应腔体上设有物料进口和出口；变性和还原反应腔体外壁面上设有电加热膜；

所述集束式溶剂置换器包括 2 根以上管状中空纤维膜和缓冲液置换腔体；将 2 根以上根中空纤维膜集束在聚四氟管中，聚四氟管二端用环氧胶固定于变性和还原反应腔体内，以集束式中空纤维膜为蛋白质传输载体，中空纤维膜固定于缓冲液置换腔体中，集束式中空纤维膜两端穿过缓冲液置换腔体侧壁面伸出腔体外，并于缓冲液置
15 换腔体上设有物料进口和出口；

集束式高温变性和还原器中的集束式中空纤维膜入口端相连；

体液高丰度蛋白质去除系统（A）包括色谱柱，色谱柱一端经液相色谱泵与体液蛋白质样品储罐相连，色谱柱另一端与集束式高温变性和还原器中的集束式中空纤维膜入口端相连；
20

所述高通量体液蛋白质样品预处理装置是将体液高丰度蛋白质去除色谱柱的入口端与体液蛋白质样品储罐相连，从色谱柱上洗脱下来的中低丰度蛋白质直接进入集束式高温变性和还原器，高温变性和还原器上的中空纤维膜的物料流出端与溶剂置换器上的中空纤维膜的物料流入端相连通；溶剂置换器上的中空纤维膜的物料流出端与酶反应器的物料入口相连；产物由酶反应器的物料出口流出，中低丰度蛋白质通过酶
25 反应器被迅速切割成多肽，实现中低丰度蛋白质到多肽的快速转化；

集束式高温变性和还原器中的物料进口与变性还原反应液相连、出口为废液出口；

缓冲液置换腔体上设有物料进口与溶剂置换液相连、出口为废液出口。
30

2、按照权利要求 1 所述的预处理装置，其特征在于：

所述集束式高温变性和还原器采用 2-100 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质的传输载体，并固定于变性和还原反应腔体中，通过液相色谱泵或蠕动泵将高浓度变性剂和还原剂输送至变性和还原反应腔体，并与蛋白质充分混合，在温控系统作用下加热并完成变性还原反应；

35 所述集束式溶剂置换器采用 2-100 根中空纤维膜作为体液中低丰度蛋白质传输载体，并固定于缓冲液置换腔体中，通过液相色谱泵或蠕动泵将低浓度弱碱性缓冲溶液输送至缓冲液置换腔体，使蛋白质溶剂与交换液发生置换，从而达到蛋白质除盐的目的；

酶反应器中装填的基质材料为 10-30 μm 粒径的硅胶颗粒材料；蛋白酶通过共价键合附的方式固定在材料表面，所述酶为胰蛋白酶，酶液浓度范围为 10-50 mg/mL；
40

将集束式高温变性和还原器，溶剂置换器和酶反应器依次串联构成集束式蛋白质样品预处理装置。

3、按照权利要求 1 所述的预处理装置，其特征在于：

液相色谱泵或蠕动泵的流量范围 0.1mL/min-5mL/min，温控装置的加热温度范围

60-95℃；

变性剂的种类可以为盐酸胍或尿素，浓度为 4-8M，蛋白质还原剂的种类可以为二硫苏糖醇、硫醇、三(2-羧乙基)膦，浓度为 5-100 mM；

5 低浓度碱性缓冲溶液可以为碳酸氢铵或醋酸铵溶液，浓度范围为 10-100mM，pH 范围为 7.5-8.5。

4、按照权利要求 1 所述的预处理装置，其特征在于：

所述的体液高丰度蛋白质去除抗体柱的适用的洗脱流量范围为 50-1000 μ L/min，体液蛋白质处理量为 0.3-1 mg，体液包括血浆、血清或尿液。

10 5. 一种权利要求 1-4 任一所述的高通量体液蛋白质样品预处理装置可用于临床诊断和疾病蛋白质组学研究中的体液蛋白质快速预处理过程。

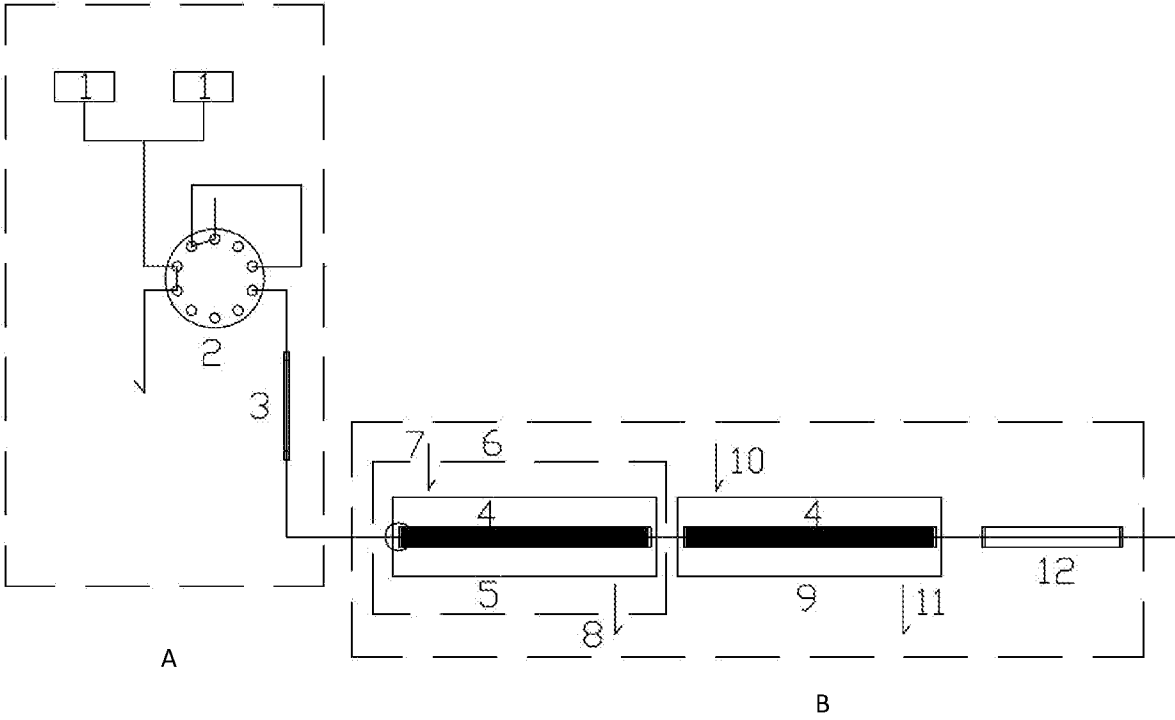


图1

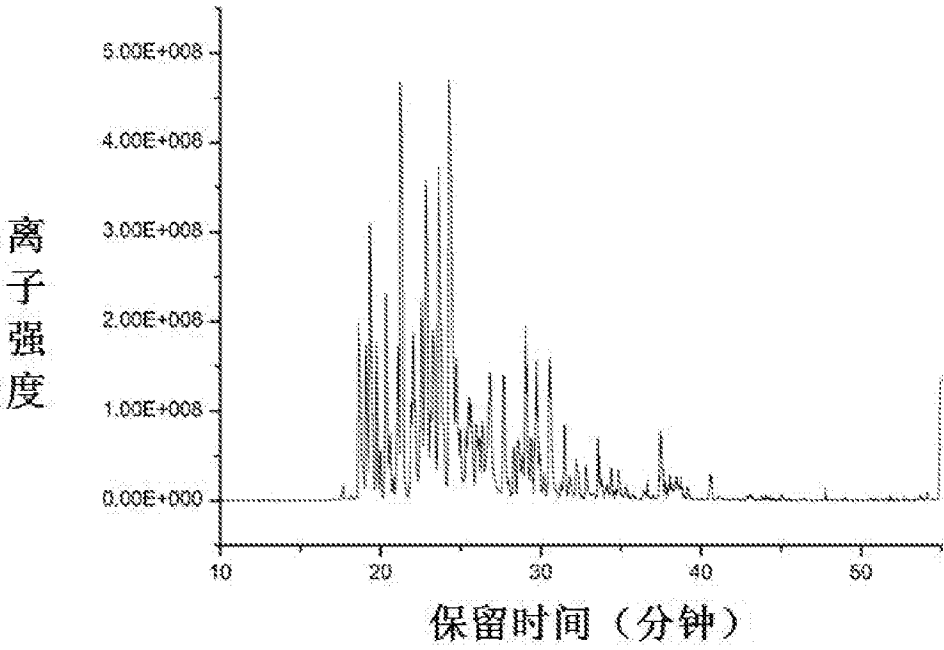
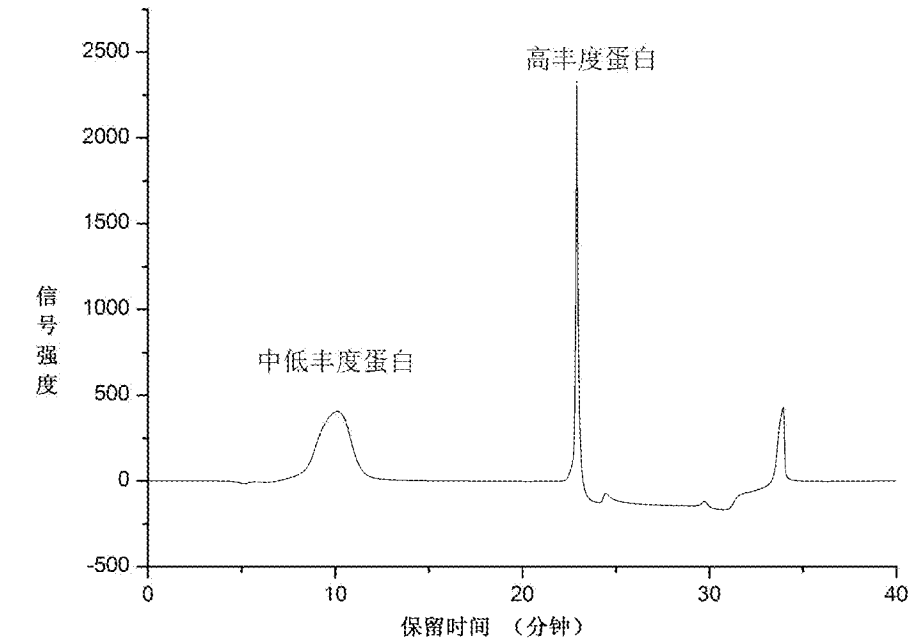
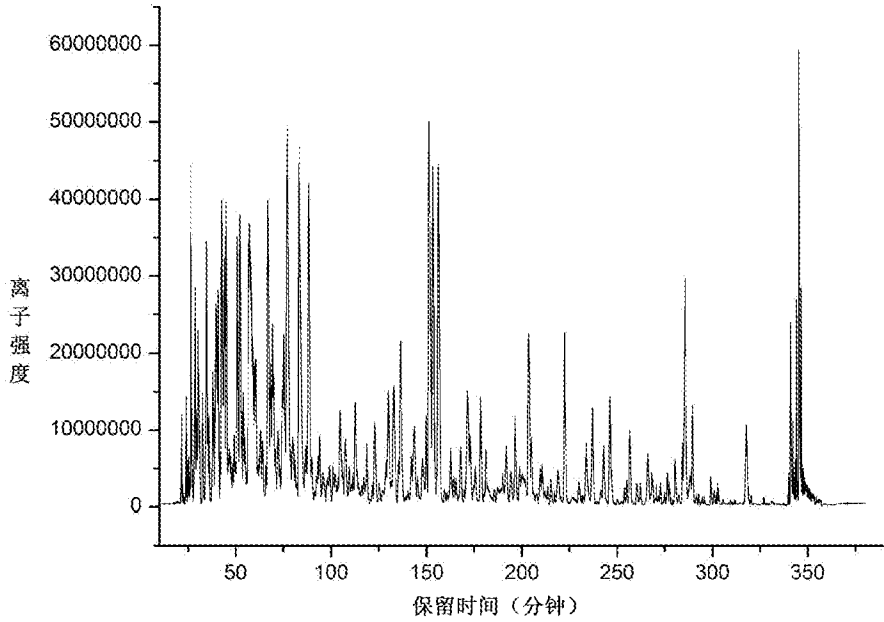


图2



a



b

图 3

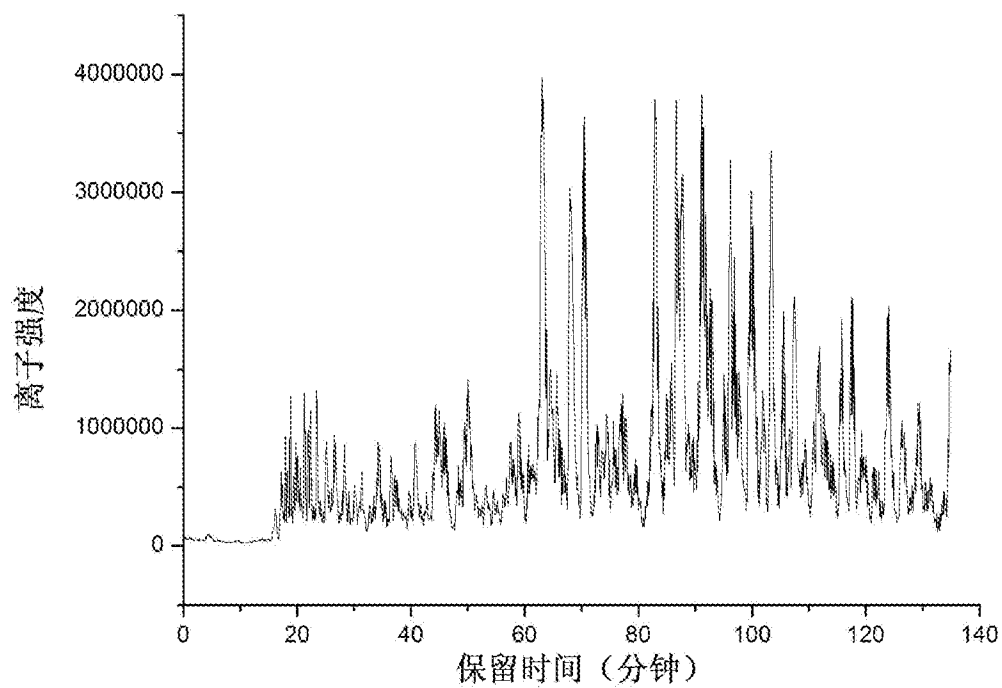


图 4

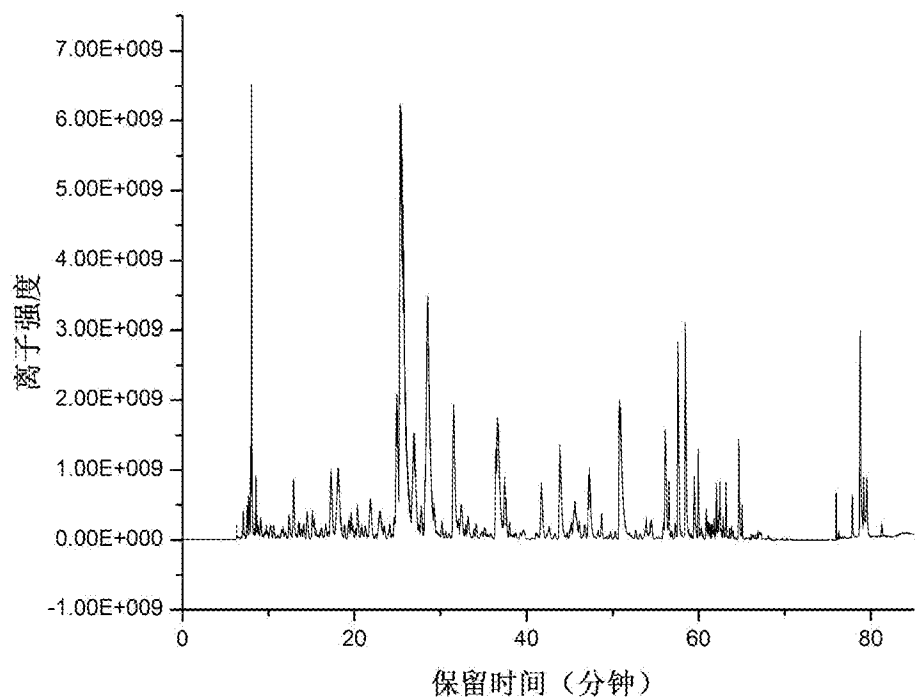


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/092561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/06 (2006.01) i; G01N 30/02 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 30/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, CNPAT, CNKI: 张丽华, 袁辉明, 戴忠鹏, 杨开广, 张玉奎, 体液, 血浆, 血清, 尿, 蛋白质, 蛋白, 高丰度, 低丰度, 变性, 还原, 除盐, 酶解, 酶反应, 微酶, 除去, 去除, serum, plasma, urine, high?abundant?? w protein?, deplet+, remov+, IMER, zhanglihua, lihuazhang, yuanhuiming, huimingyuan, daizhongpeng, zhongpengdai, yagnkaiguang, kaiguangyang, zhangyukui? yukuizhang

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103852527 A (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 11 June 2014 (11.06.2014), description, paragraphs [0011]-[0026] and [0048]-[0049], and figure 1	1-5
A	CN 103212217 A (FUDAN UNIVERSITY), 24 July 2013 (24.07.2013), entire document	1-5
A	CN 104713963 A (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 17 June 2015 (17.06.2015), entire document	1-5
A	CN 103864967 A (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 18 June 2014 (18.06.2014), entire document	1-5
A	CN 104634915 A (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 20 May 2015 (20.05.2015), entire document	1-5
A	US 2011118453 A1 (TORRES, A.R.), 19 May 2011 (19.05.2011), entire document	1-5
A	US 2006154302 A1 (BROWN, T.R.), 13 July 2006 (13.07.2006), entire document	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 11 August 2017	Date of mailing of the international search report 30 August 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer DONG, Chunyan Telephone No. (86-10) 62414377

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/092561

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103852527 A	11 June 2014	CN 103852527 B	13 May 2015
CN 103212217 A	24 July 2013	CN 103212217 B	13 May 2015
CN 104713963 A	17 June 2015	CN 104713963 B	15 February 2017
CN 103864967 A	18 June 2014	CN 103864967 B	23 March 2016
CN 104634915 A	20 May 2015	CN 104634915 B	29 March 2017
US 2011118453 A1	19 May 2011	US 2013164827 A1	27 June 2013
		US 8304248 B2	06 November 2012
		WO 2011060438 A2	19 May 2011
		US 8993334 B2	31 March 2015
US 2006154302 A1	13 July 2006	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/092561

A. 主题的分类

G01N 30/06(2006.01)i; G01N 30/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N 30/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

EPODOC, WPI, CNPAT, CNKI; 张丽华, 袁辉明, 戴忠鹏, 杨开广, 张玉奎, 体液, 血浆, 血清, 尿, 蛋白质, 蛋白, 高丰度, 低丰度, 变性, 还原, 除盐, 酶解, 酶反应, 微酶, 除去, 去除, serum, plasma, urine, high?abundant?? w protein?, deplet+, remov+, IMER, zhanglihua, lihuazhang, yuanhuiming, huimingyuan, daizhongpeng, zhongpengdai, yagnkaiguang, kaiguangyang, zhangyukui, yukuizhang

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 103852527 A (中国科学院大连化学物理研究所) 2014年 6月 11日 (2014 - 06 - 11) 说明书[0011]-[0026], [0048]-[0049]段、图1	1-5
A	CN 103212217 A (复旦大学) 2013年 7月 24日 (2013 - 07 - 24) 全文	1-5
A	CN 104713963 A (中国科学院大连化学物理研究所) 2015年 6月 17日 (2015 - 06 - 17) 全文	1-5
A	CN 103864967 A (中国科学院大连化学物理研究所) 2014年 6月 18日 (2014 - 06 - 18) 全文	1-5
A	CN 104634915 A (中国科学院大连化学物理研究所) 2015年 5月 20日 (2015 - 05 - 20) 全文	1-5
A	US 2011118453 A1 (TORRES, ANTHONY R.) 2011年 5月 19日 (2011 - 05 - 19) 全文	1-5
A	US 2006154302 A1 (BROWN, THOMAS R.) 2006年 7月 13日 (2006 - 07 - 13) 全文	1-5

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 8月 11日

国际检索报告邮寄日期

2017年 8月 30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

董春艳

电话号码 (86-10)62414377

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/092561

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103852527	A	2014年 6月 11日	CN	103852527	B	2015年 5月 13日
CN	103212217	A	2013年 7月 24日	CN	103212217	B	2015年 5月 13日
CN	104713963	A	2015年 6月 17日	CN	104713963	B	2017年 2月 15日
CN	103864967	A	2014年 6月 18日	CN	103864967	B	2016年 3月 23日
CN	104634915	A	2015年 5月 20日	CN	104634915	B	2017年 3月 29日
US	2011118453	A1	2011年 5月 19日	US	2013164827	A1	2013年 6月 27日
				US	8304248	B2	2012年 11月 6日
				WO	2011060438	A2	2011年 5月 19日
				US	8993334	B2	2015年 3月 31日
US	2006154302	A1	2006年 7月 13日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)