



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I683821 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：106114649

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 06 月 03 日

(51)Int. Cl. : C07K1/14 (2006.01)

C12M1/42 (2006.01)

B01D11/04 (2006.01)

(30)優先權：2007/06/04 美國

60/933,209

2007/09/17 美國

60/972,971

(71)申請人：派許爾生化科學公司 (美國) PRESSURE BIOSCIENCES INC. (US)

美國

(72)發明人：萊薩弗 亞歷山大 LAZAREV, ALEXANDER (US) ; 葛洛斯 維拉 GROSS, VERA

(US)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

TW 20096847A

US 6150172

US 2002/0197631A1

Bichon E et al., LC-ESI-MS/MS determination of phenylurea and triazine herbicides and their dealkylated degradation products in oysters. J Chromatogr B.2006 Jul 11;838(2):96-106.

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：4 共 116 頁

(54)名稱

分子萃取及分配技術

(57)摘要

自多數組分萃取一有興趣的組分之方法係被描述。

Methods of extracting a component of interest from a plurality of components are described.

指定代表圖：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

分子萃取及分配技術

EXTRACTION AND PARTITIONING OF MOLECULES

【技術領域】

對相關申請案的相互參照

[0001]本申請案主張對在2007年6月4日提申的美國編號 60/933,209 以及在 2007 年 9 月 17 日提申的美國編號 60/972,971 的優先權。前面提到的申請案之內容係特此全面地被併入以爲參考。

[0002]本發明係爲一種分子萃取及分配技術。

【先前技術】

發明背景

[0003]目前的萃取方法對一定種類的分子通常係爲特定的以排除且損失其他種類分子。通常，一待被分析的試樣爲大小上受限制且一類型分子的萃取耗盡試樣或防止來自試樣之另外的種類分子之萃取。液液分配已經被應用於從複雜混合物中基於在不同溶劑中分子的微差溶解度之分子本體的萃取。然而，當非互溶的或部分地互溶溶劑用於液液分配之時，在溶劑之間的交換只發生在溶劑界面上，然而剩下大量溶劑係被與彼此相互作用隔絕。因此，在溶劑之間分子的分配需要劇烈機械搖動以在溶劑之間維持一液液表面界面的大面積。一般，溶劑的搖動係在分液漏斗中被實施且係以存在於漏斗中之一過量的氣體被進行以促

用搖動的乳化[作用]。經萃取之分子可易遭發生空氣氧化[作用]或不然由一氣相的存在所影響，例如，在有清潔劑的情況下之泡沫形成，因此，使慣用液液萃取方法變得不便利、效率低的或不可能的。

【發明內容】

發明概要

[0004] 本發明揭示內容特別是提供萃取方法，其中，該等方法使一本體(例如，組分)或多種類分子本體(例如，組分)可以藉由應用非互溶的萃取溶劑(例如，液相或溶劑相)的混合物從一試樣(例如，混合物或多數組分)被萃取，其中，該等溶劑對數種種類試樣-衍生組分可具有顯然不同的親和性。該等方法可用於，例如，液液萃取、凝膠-液萃取、懸浮液-液萃取。在某些具體實施例中，壓力(例如，一壓力週期)可在萃取方法中被使用。在某些具體實施例中，一不勻相共沸液為存在的且溶劑的相互共沸溶解度係藉由增加的壓力(例如，液體靜壓力)對試樣的作用而被改變，例如，在一含有一或多種萃取溶劑以及試樣的萃取室中。高壓可直接地藉由減少微胞的大小或將其等毀壞而影響微胞[參照，例如，Ennaceur and Sanderson, Langmuir 21 : 552-561 (2005)]。壓力的週期(例如，液體靜壓力)，例如，從周圍壓力至高壓且然後降低壓力(例如，回降到周圍壓力) (壓力循環)，可比壓力的非-循環應用更有效地毀壞細胞以及組織(參照，例如，美國專利第6,274,726 ; 6,120,985 ; 6,270,723 ; 以及6,696,019號)。

[0005]如在此所使用的，用語“萃取”以及“萃取的”表示，在一相中(例如，多數液相之一相)，一組分(例如，一有興趣的組分)超過其他組分(例如，污染物)的增強。在某些具體實施例中，萃取不是一完全萃取而是一部分的萃取，在沒有完全地移除及/或分離一組分的情況下，加強一組分(例如，一有興趣的組分)的相對量勝過另一者，該一組分係與其他(諸)組分(例如，污染物)比較(例如，該約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%的一組分係被與其他(諸)組分隔絕。在某些具體實施例中，一組分係從其他(諸)組分中被完全地萃取[例如，係完全地被和其他(諸)組分分開]。

[0006]在某些態樣中，壓力循環可用來毀壞或降低微胞及/或乳膠的數目，特別是當界面活性劑或清潔劑用來幫助在水萃取溶劑中之疏水本體的溶解化作用之時。其中，該等微胞及/或乳膠係在分子本體(例如，來自薄膜、細胞、組織以及複合基質)之萃取的期間被形成。壓力(例如，液體靜壓力)的重複應用可導致微胞以及乳膠的破壞且導致試樣-衍生分子之分配到分開的液相裡，基於其等之物理化學性質。

[0007]此外，本發明的揭示內容描述溶劑(例如，一或多種溶劑)以增進試樣-衍生分子本體在溶劑之中的分配之用途且溶劑在周圍壓力以及室溫(例如，約25°C)具有差的互溶度(例如，氯仿係在0.815% w:w用水溶解的，己烷係

只在0.001% w:w用水溶解的)。高壓可改變溶劑的互溶度。藉由選擇適當的溶劑、溶劑的量以及壓力位準，暫時地將非互溶的溶劑以及將被萃取的試樣混合是可能的，其導致一介穩定混合物的形成，在那裡，產生的可溶性溶劑具有經改變的性質，例如，溶解試樣組分的能力。當部分地解離的化合物係正被分配之時，此介穩定系統的降壓(例如，迅速降壓)引起混合物的分離成性質不同的部分以及介於溶劑之間的分子本體之分配，根據各個其等個別的物理化學性質(諸如，分配係數， $\log P$ ；或分配係數， $\log D$) (參照，例如，Paternoste等人，*Biophys. J.* 69：2476-2488 (1995)以及在那裡所舉的參考文獻)。在某些具體實施例中，清潔劑的使用可藉由在萃取的期間使用一些溶劑而被大大地減少或避免。

[0008]再者，本發明的揭示內容描述溶劑之三元以及較高的混合物的用途，兩或多種非互溶的溶劑係以一兩親的溶劑(例如，溶劑)而被添增之處係互溶至一比以任何一個另外非互溶的液相，例如，水以及油，還要大的程度。一兩親的溶劑的存在進一步增強增加的(例如，高)壓力的能力以改變在相互範圍之內之溶劑的互溶度且，在將壓力減少到一較低的位準的時候，以加速正被萃取成性質不同的相之試樣(例如，混合物)的組分之分配。兩親的溶劑不僅可與水相形成穩定結合(由於氫鍵鍵合)而且可與油以及脂質借助於疏水作用形成穩定結合。因此，在某種具體實施例中，藉由壓力循環所促進之在兩親的溶劑中多組分試樣的溶解

將引起親脂性以及親水化合物之一相分離成兩或多種液相，其中該等液相接著可被機械性分離。

[0009] 在一態樣中，本發明揭示內容以一種從多數組分中萃取一有興趣的組分之方法為特色。該方法包括

提供一試樣(例如，混合物)，該試樣含有多數組分以及至少一液相(例如，多數液相，例如，至少兩液相)(例如，形成非互溶的液相)，其中該試樣(例如，混合物)係在一第一液體靜壓力；

將該試樣(例如，混合物)暴露於一第二液體靜壓力，其中該第二液體靜壓力係大於該第一液體靜壓力，造成一另外的液相之形成；

將壓力自該第二液體靜壓力減低，藉此從該多數組分中萃取該有興趣的組分[例如，增加在液相之一者中該有興趣的組分之百分比(或比例)]。

[0010] 在某些具體實施例中，多數組分包括多變化的疏水性之組分。

[0011] 在某些具體實施例中，多數組分包括(例如，提供)多數液相之一相。

[0012] 在某些具體實施例中，一液相在萃取完成的期間或時候形成一固相。

[0013] 在某些具體實施例中，多數組分的一組分係可溶於多數液相的一液相的。

[0014] 在某些具體實施例中，多數組分的一組分係不可溶於多數液相的一液相的。

[0015] 在某些具體實施例中，多數組分包括一膠體。如在此所使用的，一膠體或膠態分散體為一用肉眼看(看來)似乎是一勻相溶液的不勻相混合物。一不勻相混合物為一兩相的混合物，而一溶液為一相。在一膠體中，分散相係由遍及連續相被均勻的分佈之小粒子或小滴構成。膠體的實施例包括奶、乳劑、霧劑(例如，霧、煙霧、煙)、柏油、油墨、塗料、膠以及海泡沫。

[0016] 在某些具體實施例中，多數組分包含一乳膠。如在此所使用的，一乳膠為一膠體的一種。一乳膠為一兩種非互溶的物質之混合物。一物質(分散相)係被分散於另一種(連續相)之中。乳膠的實施例包括奶油、人造奶油、濃縮咖啡、美奶滋、照相軟片的感光面、用於金屬加工的切削液、塗料、油墨、潤滑劑、局部用藥、洗劑、化妝品製劑等等。在奶油以及人造奶油中，一連續液相環繞水的小滴(油包水乳膠)。

[0017] 在某些具體實施例中，至少兩液相在第一液體靜壓力為非互溶。

[0018] 在某些具體實施例中，至少兩液相在第二液體靜壓力為互溶(例如，完全地互溶)。

[0019] 在某些具體實施例中，至少兩液相在第一液體靜壓力為非可溶。

[0020] 在某些具體實施例中，至少兩液相在第一液體靜壓力為部分地可溶。

[0021] 在某些具體實施例中，至少兩液相在第二液體靜壓力為部分地可溶。

[0022] 在某些具體實施例中，至少兩液相在第二液體靜壓力為完全地可溶。

[0023] 在某些具體實施例中，第二液體靜壓力係被減壓成一等於第一液體靜壓力的第三液體靜壓力。在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於一第四壓力，其中第四壓力係大於第一、第二或第三壓力。

[0024] 在某些具體實施例中，第二液體靜壓力係被減壓成一大於第一液體靜壓力的第三液體靜壓力。在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於一第四壓力，其中第四壓力係大於第一、第二或第三壓力。

[0025] 在某些具體實施例中，第二液體靜壓力係被減壓成一小於第一液體靜壓力的第三液體靜壓力。在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於一第四壓力，其中第四壓力係大於第一、第二或第三壓力。

[0026] 在某些具體實施例中，將壓力自第二液體靜壓力減低引起至少兩液相之分離變成分開的相且有興趣的組分係被分配到至少兩液相之一者裡。

[0027] 在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於一第三壓力以及一第四壓力，其中第四壓力係大於第一、第二或第三壓力。

[0028] 在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)含有一包含一試劑的第二容器。在某些具體實施例中，暴露在第二、第三或第四液體靜壓力之下使第二容器釋出其內含物，藉此將該試劑引入試樣(例如，混合物)。

[0029] 在某些具體實施例中，多數組分係被分配到一並不包括有興趣的組分(例如，實質上無有興趣的組分)的液相裡。

[0030] 在某些具體實施例中，方法進一步包括將有興趣的組分與液相隔絕/純化。

[0031] 在某些具體實施例中，液相係以部分形式而被分離。

[0032] 在某些具體實施例中，經萃取之有興趣的組分係直接地與一下游程序(例如，分析方法，例如，HPLC或LC/MS)相容。

[0033] 在某些具體實施例中，有興趣的組分為一蛋白質(例如，膜結合蛋白、跨膜性蛋白、I型或II型膜蛋白、受體、酶、一脂蛋白、一糖蛋白)。在某些具體實施例中，蛋白質的構型係在萃取的期間(或藉由萃取的完成)而被改變。

[0034] 在某些具體實施例中，有興趣的組分為一多醣(例如，肝素或肝素衍生多醣)、一多酚(例如，一單寧)、一苯基丙酸類(例如，一木[質]素、一類黃酮)、一維生素、一毒素、一污染物[質]、一脂質{例如，磷脂[例如，卵磷脂(PtdCho)、磷脂醯乙醇胺(PtdEtn)、磷脂醯肌醇(PtdIns)、磷脂醯絲胺酸(PtdSer)]、糖脂、類固醇[例如，雌激素、孕酮、雄激素、睪酮、蛻皮類固醇(諸如，蛻皮固酮)、皮質類固醇激素(諸如，糖皮質[激]素以及鹽皮質[激]素)、促蛋白質合成類固醇、膽固醇、植物固醇、油菜固醇、麥角固醇]}、一薄膜(細胞膜、胞器膜、脂雙層)、存在於一細菌包含體中的一組分、一抗原(例如，來自一細菌)、一病毒(例如，用

於疫苗生產者)、一藥學試劑[諸如,一小分子、一代謝物(例如,一小分子代謝物)]、一藥物(例如,一藥學藥物)、一藥物代謝物、一染料、一食品成分、一奈米粒子配方、一脂筏、一澱粉斑塊、微管、細胞溶質或一特定細胞類型。

[0035]在某些具體實施例中,有興趣的組分為一核酸[DNA(核DNA、粒線體DNA)、RNA(信使RNA、轉移RNA、核糖體RNA)]。

[0036]在某些具體實施例中,有興趣的組分為一病毒(例如,HIV;HPV;A、B、C、D、E、F或G型肝炎;巨細胞病毒、愛波斯坦-巴爾病毒、黃熱病等等)或一細菌(例如,革蘭氏陽性或革蘭氏陰性菌、互利共生體細菌、病原細菌)。

[0037]在某些具體實施例中,有興趣的組分為一殺蟲劑[例如,殺菌劑、殺真菌劑、除草劑、殺蟲藥(例如,殺卵劑、殺幼蟲劑或殺成蟲劑)、殺蟎劑、軟體動物殺滅劑、殺線蟲劑、殺鼠劑或殺病毒劑]。

[0038]在某些具體實施例中,有興趣的組分為疏水的。

[0039]在某些具體實施例中,有興趣的組分為親水的。

[0040]在某些具體實施例中,有興趣的組分為親水親油的/兩親的。

[0041]在某些具體實施例中,有興趣的多數組分係從該多數組分中被萃取。在某些具體實施例中,有興趣的多數組分含有一核酸以及一蛋白質。

[0042]在某些具體實施例中,多數組分包含一細胞(例如,原核的或真核生物的)、一胞器(例如,粒線體、核、高

爾基體、葉綠體、內質網、液泡、頂體、中心粒、纖毛、乙醛酸循環小體、氫化酶體、溶酶體、黑素體、線體、肌原纖維、核仁、括弧體、過氧化物酶體、核糖體、微粒體、小泡)、一薄膜、一生物試樣[組織試樣(脂肪組織、肝臟、腎臟、皮膚、胰臟、胃、小腸、大腸、乳房、卵巢、子宮、前列腺、骨骼、腱、軟骨、頭髮、指甲、牙齒、心臟、腦、肺臟、皮膚、活體檢視等等)、血液、尿液、奶、精液、唾液、黏液、其他體液以及固體]、細胞的聚集(例如，血液、精液、黏液、唾液、組織活體檢視)。

[0043]在某些具體實施例中，多數組分具有生物起源。在某些具體實施例中，生物起源的多數組分係來自一動物[例如，哺乳動物的(例如，人或家畜)]、爬蟲類動物、兩棲動物、魚、昆蟲、鳥類、真菌、細菌、病毒或植物。在某些具體實施例中，生物起源的多數組分係來自一古代的試樣，例如，化石(例如，化石動物、化石木材、化石骨骼、化石牙齒、化石糞等等)。

[0044]在某些具體實施例中，多數組分包括一乳膠(例如，乳膠漆、潤滑劑等等)。

[0045]在某些具體實施例中，多數組分為合成/人造(例如，油墨、潤滑劑、乳膠漆、乳劑、洗劑、燃料、液體推進劑、彈性體)。

[0046]在某些具體實施例中，多數組分係被暴露於一壓力週期，其中第一、第二以及第三液體靜壓力為壓力週期的部分。

[0047]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於經重複之壓力週期。

[0048]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於介於約1以及約1000之間的壓力週期。

[0049]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於一第三液體靜壓力，其中第三液體靜壓力係小於第一液體靜壓力。

[0050]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於一第三液體靜壓力，其中第三液體靜壓力係等於第一液體靜壓力。

[0051]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於一第三液體靜壓力，其中第三液體靜壓力係大於第一液體靜壓力。

[0052]在某些具體實施例中，第一液體靜壓力係介於約 1.33×10^{-7} MPa至約1,000 MPa之間。

[0053]在某些具體實施例中，第一液體靜壓力係介於約 0.1 Mpa至約1,000 Mpa之間。

[0054]在某些具體實施例中，第二液體靜壓力係在約 1,000 MPa以內。

[0055]在某些具體實施例中，第二液體靜壓力係介於約 100 kPa以及約1,000 Mpa之間。

[0056]在某些具體實施例中，第二液體靜壓力係介於約 133kPa以及約1,000 MPa之間。

[0057]在某些具體實施例中，在介於第一以及第二液體

靜壓力之間之壓力方面的差異係介於約10 kPa至1 Gpa之間。

[0058]在某些具體實施例中，該方法係在一介於約-40°C以及約+100°C之間的溫度(例如，-2°C、25°C、70°C)而被進行。

[0059]在某些具體實施例中，壓力為液壓或氣壓。

[0060]在某些具體實施例中，多數液相包含一沸液。

[0061]在某些具體實施例中，多數液相包含一按數種特定比例之數種液體的混合物。

[0062]在某些具體實施例中，多數液相為雙相的。

[0063]在某些具體實施例中，多數液相為三相的。

[0064]在某些具體實施例中，多數液相包括一水溶劑{例如，水或緩衝化合物及/或鹽類的水溶液[諸如，磷酸鹽緩衝劑、磷酸鹽緩衝劑/鹽水、三羥甲基胺基甲烷(Tris)緩衝液、2-(N-嗎啉)-乙基磺酸(MES)緩衝液、N-2-羥乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES)緩衝液、碳酸氫銨等等)。

[0065]在某些具體實施例中，多數液相包括一有機溶劑(一含碳的溶劑)(例如，乙酸、丙酮、乙腈、異丙醇、叔丁醇、二氯甲烷或甲醇)。

[0066]在某些具體實施例中，多數液相包括一無機非水溶劑，該溶劑為除水以外的溶劑，非為一有機溶劑(例如，液態氮、液態二氧化硫、硫醯氯、硫醯氯氟、磷醯氯、四氧化二氮、三氯化銻、五氟化溴、氟化氫、純硫酸以及另一無機酸)。

[0067]在某些具體實施例中，多數液相包括氯仿、四氯乙烯、甲醇、異丙醇、乙醇、另一醇類[例如，氟化醇(例如，1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)、2,2,2-三氟乙醇(TFE)、2-氟乙醇、2,2,3,3-四氟丙-1-醇、1,3-二氟丙-2-醇)]、水、或一脂族烴(己烷、庚烷)、乙腈、甲酸、三氟乙酸、甘油、脂質(例如，甘油三酯、磷脂、(神經)鞘脂類、糖脂土壤(glycolipidsoil))、氟烴、其他鹵化碳、清潔劑的溶液、緩衝液、離液序列高的鹽類及/或其等之混合物。

[0068]在某些具體實施例中，多數液相包括一質子溶劑(例如，水、甲醇、乙醇、甲酸、氟化氫或氨水)。

[0069]在某些具體實施例中，多數液相包括一無質子溶劑(例如，二甲亞砷、二甲基甲醯胺、六甲基偶磷基醯三胺或其等之混合物)。在某些具體實施例中，該(等)溶劑係自經萃取之有興趣的組分被移除，例如，於有興趣的組分之進一步加工以前。

[0070]在某些具體實施例中，該(等)溶劑係藉由蒸發而被移除[例如，在周圍溫度(例如，約20至約23.5°C)或在升高的溫度(例如，一高於周圍溫度的溫度，例如，約27°C、約30°C、約32°C、約35°C、或約37°C、或大於)]。

[0071]在某些具體實施例中，該(等)溶劑係藉由沈澱有興趣的組分(例如，藉由水的添加)，例如，以及藉由移除溶劑上清液且藉由將其用一選擇的溶劑來替換而被移除。

[0072]在某些具體實施例中，最佳化的鹽濃度可用來選擇地沈澱所欲的蛋白質且將不欲的組分保持在上清液中且

反之亦然。例如，此一途徑可用來減少一高度地高豐度蛋白質物種的複合試樣(例如，血清清蛋白、免疫球蛋白等等)且為生物顯著性的低高豐度蛋白質而濃集。

[0073]在某些具體實施例中，多數組分提供一液相或多數液相。

[0074]在某些具體實施例中，液相為一脂質、有機溶劑、含水緩衝液、乳膠或固體粒子的懸浮液。

[0075]在某些具體實施例中，液相係自一固相在液體靜壓力之下而被形成[例如，一或多種液相為一組分(例如，冰)，其具有一熔融溫度高於萃取程序之溫度(例如，低於0°C)]。一旦試樣(例如，混合物)係被加壓至一液體靜壓力的預定位準，一相轉移發生且具有一熔融溫度高於萃取程序之溫度的組分(例如，冰)熔化變為一液相。

[0076]在某些具體實施例中，一固相係自一液相在液體靜壓力之下，例如，在液體靜壓力之下，而被形成。

[0077]在某些具體實施例中，該方法係在低滲壓鹽濃度之下被進行。

[0078]在某些具體實施例中，該方法係在高滲壓鹽濃度之下被進行。該方法係在高滲壓鹽濃度之下被進行。

[0079]在某些具體實施例中，該方法係在等滲透壓鹽濃度之下被進行。

[0080]在某些具體實施例中，鹽濃度係被改變以選擇性地沈澱一有興趣的組分及/或以維持在溶液中之一污染物。

[0081]在某些具體實施例中，鹽濃度係被改變以選擇性

地沈澱一污染物及/或以維持在溶液中之一有興趣的組分。

[0082]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包括一清潔劑(例如，SDS)。

[0083]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)為無或實質上無清潔劑。

[0084]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包括礦油。

[0085]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包括一緩衝液[例如，磷酸鹽緩衝液(PBS)]。

[0086]在某些具體實施例中，一蛋白質係從一生物薄膜中被萃取。

[0087]在某些具體實施例中，一蛋白質係從一脂質相中被萃取。

[0088]在此所描述的方法之一實施例如下。使用在此所描述的方法，一蛋白質、一核酸或一脂質可從脂肪組織、腦、神經、奶油、乳脂等等中被萃取。一組成可從一乳膠或固體粒子的懸浮液[諸如，一藥學或化妝品配方(軟膏、洗劑、乳劑、洗髮精、潤髮液、奈米粒子藥物配方等等)]被萃取。一組成可從一取片劑、膠囊或膠囊錠形式形狀之藥學配方被萃取。一成分可從一多相組分物[諸如，乳膠或固體粒子的懸浮液(例如，油墨、塗料、噴漆、潤滑劑、燃料、用於化學合成的成份等等)、脂質體的懸浮液、膜囊等等]被萃取。油、萜及/或其他親脂性化合物可從植物材料中被萃取。數種化合物(例如，生物鹼、類黃酮、異黃酮、原花

色素、花色素苷)可從植物中被萃取(例如，藥用植物)。食物調味劑成分(例如，辣椒素)可從食物製備中被萃取。一脂溶性維生素(例如，一生育酚、類胡蘿蔔素、蕃茄紅素等等)可從植物油或動物脂肪中被萃取。局部藥物配方組成可從皮膚以及深部組織中被萃取。

[0089]在某些具體實施例中，一組分(例如，一染料)係從塗料中被萃取。

[0090]在某些具體實施例中，一組分係從土壤中被萃取。

[0091]在某些具體實施例中，一組分係從固體粒子的懸浮液中被萃取。

[0092]在某些具體實施例中，多數組分包括一乳膠。

[0093]在某些具體實施例中，多數組分包括一脂質或一在脂質或一脂質混合物中之一或多種組分的溶液。

[0094]在某些具體實施例中，該多數組分進一步包括一蛋白質、脂蛋白、糖蛋白、糖脂、類固醇、維生素、藥物物質或藥物代謝物。在某些具體實施例中，多數組分包含一細胞或一單細胞微生物。

[0095]在某些具體實施例中，該方法分配在多數液相之中多數組分，該方法包括

提供一試樣(例如，混合物)，其中該試樣(例如，混合物)包含多數組分以及多數液相，其中該多數液相在周圍壓力具有差的互溶度且該多數液相係被分級分離；

將該試樣(例如，混合物)暴露於一壓力的增加，其中該增加之壓力增加該多數液相的互溶度，藉此將該差的互溶

度之多數液相混合且引起一介穩定混合物的形成；以及

將該試樣(例如，混合物)的壓力下降，藉此減少該等液相的溶解度且造成該多數液相的分離或部分以及引起在該多數液相之中之該等組分的分配。

[0096]在某些具體實施例中，多數液相在周圍溫度具有差的互溶度。

[0097]在某些具體實施例中，本發明的揭示內容提供一從多數組分中萃取一有興趣的組分的方法。該方法包括：

提供一包括多數組分以及多數液相的試樣(例如，混合物)，其中試樣(例如，混合物)係在一第一液體靜壓力；

將試樣(例如，混合物)暴露於一第二液體靜壓力中，其中第二液體靜壓力係大於第一液體靜壓力且在多數液相中的至少兩液相變得部分地互溶，造成一具有經改變的性質之混合液相且導致一至少一組分的溶解；以及

將試樣(例如，混合物)暴露於一第三液體靜壓力中，其中第三液體靜壓力係低於第二液體靜壓力且其中將試樣(例如，混合物)暴露於一第三液體靜壓力(例如，從第一至第二至第三壓力的轉移)中引起從多數組分之有興趣的組分之分離，藉此從多數組分[例如，增加在液相之一者中該有興趣的組分之百分比(或比例)]中萃取有興趣的組分。

[0098]在某些態樣中，本發明揭示內容以一種從脂肪組織或從另一具高脂質含量的試樣中萃取有興趣的(諸)蛋白質之方法為特色。該方法包括：

提供一含有多數組分的試樣(例如，混合物)且含有大量

的脂質(諸如，脂肪組織或腦組織)以及至少一液相(或多數的液體)(例如，形成非互溶的液相)，其中該試樣(例如，混合物)係在一第一液體靜壓力；

將該試樣(例如，混合物)暴露於一第二液體靜壓力，其中第二液體靜壓力係大於第一液體靜壓力，造成液相在相互狀況下完全或部分的溶劑合[作用]，藉此造成有興趣的(諸)蛋白質之溶解。該方法可進一步包括：

將壓力自該第二液體靜壓力減低，藉此造成另外的一或多種液相之形成，藉此將在液相之間的多數組分分配，其中有興趣的(諸)蛋白質係被分配到一液相裡。

[0099]在某些具體實施例中，含有多數組分之產生的液相係以部分形式而被分離。

[0100]在某些具體實施例中，(諸)液相包括一溶劑。

[0101]在某些具體實施例中，含有該(等)有興趣的蛋白質之產生的液相(例如，有機相)可直接地被分析或溶劑可被移除用於含有該(等)有興趣的蛋白質之液相的進一步加工。

[0102]在某些具體實施例中，溶劑可藉由蒸發而被移除[例如，在周圍溫度(例如，約20至約23.5°C)或在升高的溫度(例如，一高於周圍溫度的溫度，例如，約27°C、約30°C、約32°C、約35°C、或約37°C、或大於)]。

[0103]在某些具體實施例中，溶劑可藉由沈澱有興趣的(諸)蛋白質、藉由移除溶劑上清液且藉由將其用一選擇的溶劑來替換而被移除。

[0104]在某些具體實施例中，最佳化的鹽濃度可用來選擇地沈澱所欲的蛋白質且將不欲的組分保持在上清液中且反之亦然。例如，此一途徑可用來減少一高度地高豐度蛋白質物種的複合試樣(例如，血清清蛋白、免疫球蛋白等等)且為生物顯著性的低高豐度蛋白質而濃集。

[0105]在此所描述之方法的其他特質包括：

在某些具體實施例中，本發明的揭示內容提供一蛋白質萃取方法，在那裡，壓力週期用來便於試樣溶解。一試樣可含有蛋白質及/或脂質(諸如，甘油三酯、磷脂、糖脂、(神經)鞘脂類等等)或其他疏水化合物，例如，脂肪酸、脂族烴等等。

[0106]在某些具體實施例中，一試樣可含有一或多種蛋白質。

[0107]在某些具體實施例中，一試樣可含有一或多種脂質。

[0108]在某些具體實施例中，一試樣可含有或為一片脂肪組織。

[0109]在某些具體實施例中，一試樣可含有或為一腦組織。

[0110]在某些具體實施例中，一試樣可含有或為一乳膠、懸浮液或膠體。

[0111]在某些具體實施例中，一試樣可含有或為奶、一奶製品、樹汁液等等。

[0112]在某些具體實施例中，一試樣可含有或為塗料、一工業潤滑劑、一化妝品，例如，乳劑或洗劑。

[0113] 在某些具體實施例中，溶解係藉由循環壓力而被促進。

[0114] 在某些具體實施例中，溶解係藉由機械均質化而被促進。

[0115] 在某些具體實施例中，溶解係藉由超音波細胞破壞而被促進。

[0116] 在某些具體實施例中，溶解係藉由攪拌；混合；玻璃、陶瓷或金屬珠的衝擊；研磨或摻合而被促進。

[0117] 在某些具體實施例中，一液相含有或為HFIP、TFE、PFOA、2,2,2-三氯乙醇、三氟乙酸或其他鹵代醇或酸。

[0118] 在某些具體實施例中，一液相含有或為其他有機溶劑(例如，如在此所描述的)。

[0119] 在某些具體實施例中，一液相含有或為水或含水緩衝液(例如，被和一有機溶劑混合者)。

[0120] 在某些具體實施例中，一液相含有或為一些在此所描述的溶劑之一混合物。

[0121] 在某些具體實施例中，分配係藉由靜止保溫(例如，分佈在從-20到+50°C的溫度範圍內)而被完成。

[0122] 在某些具體實施例中，分配係藉由離心[分離][例如，相對離心力：分佈在從1xg (例如，無自轉)到40,000xg的範圍內]而被促進。

[0123] 在某些具體實施例中，分配係藉由一疏水液態試劑(例如，油、脂質、礦油、脂族烴等等或其等之一混合物)至試樣的添加以加速相分離而被促進，若試樣-衍生疏水材

料不足以形成一層。

[0124]在某些具體實施例中，分配係藉由以上所描述方法之任何組合而被完成。

[0125]在某些具體實施例中，試樣溶解發生，但無分配被觀察到(例如，不夠脂質存在)。

[0126]在某些具體實施例中，至少一液相係在試樣溶解之後被形成。

[0127]在某些具體實施例中，液相係藉由吸移化、淨析化、吸收等等而被物理性分離。

[0128]在某些具體實施例中，液相係使用管柱層析法(吸收的一實施例)而被分離。

[0129]在某些具體實施例中，一試樣(極性相)係被稀釋以在液相的分離之後誘發沈澱。

[0130]在某些具體實施例中，液相係不被分離，試樣係代之以被稀釋以誘發沈澱。

[0131]在另一態樣中，本發明揭示內容以一種從多數組分中萃取一有興趣的組分(例如，蛋白質)之方法為特色。該方法涉及將多數組分暴露於一溶劑[諸如，1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)、TFE、PFOA、2,2,2-三氯乙醇、三氟乙酸或其他鹵代醇或酸]。至溶劑的暴露可從大多數中萃取有興趣的組分。該方法亦可包括一機械步驟(例如，均質化步驟)，例如，以加速萃取。如另一實施例，代替著包括一機械步驟，該方法可包括將試樣暴露於一壓力變化(例如，具或不具壓力的循環)。

[0132] 在某些具體實施例中，該方法包括

提供一試樣(例如，混合物)，該試樣含有多數組分以及至少一液相(例如，多數液相)，其中該試樣含有一溶劑(例如，HFIP、TFE、PFOA、2,2,2-三氯乙醇、三氟乙酸或其他鹵代醇或酸)；以及

在試樣(例如，例如，混合物)上進行至少一加工步驟，藉此形成至少兩液相且藉此從多數組分中萃取有興趣的組分。

[0133] 在某些具體實施例中，加工步驟包括溫度、微波輻射或機械加工的一或多種。

[0134] 在某些具體實施例中，機械加工步驟包括均質化(作用)[例如，物理均質化，例如，珠磨式組織研磨器、聲波破碎、轉子-定子均質機、Dounce均質機、波特(Potter)-均質機]、漩渦化、超音波化、吸移化、剪切(例如，注射器剪切)、研磨(例如，灰泥以及(研)杵研磨)、搖動、混合、摻合、搥打等等的一或多種。在某些具體實施例中，機械加工步驟包括一質量傳送步驟(例如，劇烈混合、機械搖動或搥打)。

[0135] 在某些具體實施例中，該方法包括壓力[例如，(諸)壓力週期]與另一(諸)加工類型，例如，溫度、微波輻射或機械加工[例如，機械加工的一(或多種)類型單獨或配合壓力或另一加工類型]等等之同時(協同)或交替的應用。

[0136] 在某些具體實施例中，該方法包括兩種(或多種)加工類型，例如，溫度、微波輻射或機械加工[例如，兩種

(或多種)機械加工類型單獨或配合另一加工類型者]等等之同時(協同)或交替的應用。

[0137]在某些具體實施例中，一液相在萃取完成的期間或時候形成一固相。

[0138]在某些具體實施例中，有興趣的組分為一蛋白質。

[0139]在某些具體實施例中，有興趣的組分為一蛋白體。

[0140]在某些具體實施例中，多數組分包括多變化的疏水性之組分。

[0141]在某些具體實施例中，多數組分包括(例如，提供)多數液相之一相。

[0142]在某些具體實施例中，多數組分的一組分為可溶於多數液相之一液相的。

[0143]在某些具體實施例中，多數組分的一組分為不可溶於多數液相之一液相的。

[0144]在某些具體實施例中，多數液相包含一沸液。

[0145]在某些具體實施例中，多數液相包含一按數種特定比例之數種液體的混合物。

[0146]在某些具體實施例中，多數液相為雙相的。

[0147]在某些具體實施例中，多數液相為三相的。

[0148]在某些具體實施例中，含有該(等)有興趣的蛋白質之產生的液相(例如，有機相)可直接地被分析或溶劑可被移除用於含有該(等)有興趣的蛋白質之液相的進一步加工。

[0149]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包括一清潔劑(例如，SDS)。

[0150]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)為無或實質上無清潔劑。

[0151]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包括礦油。

[0152]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包括一緩衝液[例如，磷酸鹽緩衝液(PBS)]。

[0153]在某些具體實施例中，一蛋白質係從一生物薄膜中被萃取。

[0154]在某些具體實施例中，一蛋白質係從一脂質相中被萃取。

[0155]在某些具體實施例中，多數組分包括一膠體。如在此所使用的，一膠體或膠態分散體為一用肉眼看(看來)似乎是一勻相溶液的不勻相混合物。一不勻相混合物為一兩相的混合物，而一溶液為一相。在一膠體中，分散相係由遍及連續相被均勻的分佈之小粒子或小滴構成。膠體的實施例包括奶、乳劑、霧劑(例如，霧、煙霧、煙)、柏油、油墨、塗料、膠以及海泡沫。

[0156]在某些具體實施例中，多數組分包含一乳膠。如在此所使用的，一乳膠為一膠體的一種。一乳膠為一兩種非互溶的物質之混合物。一物質(分散相)係被分散於另一種(連續相)之中。乳膠的實施例包括奶油以及人造奶油、濃縮咖啡、美奶滋、照相軟片的感光面、用於金屬加工的切削液、塗料、油墨、潤滑劑、局部用藥、洗劑、化妝品製劑等等。在奶油以及人造奶油中，一連續液相環繞水的小滴(油包水乳膠)。

[0157] 在某些具體實施例中，多數組分係被分配到一並不包括有興趣的組分(例如，實質上無有興趣的組分)的液相裡。

[0158] 在某些具體實施例中，方法進一步包括將有興趣的組分與液相隔絕/純化。

[0159] 在某些具體實施例中，液相係以部分形式而被分離。

[0160] 在某些具體實施例中，經萃取之有興趣的組分係直接地與一下游程序(例如，分析方法，例如，HPLC或LC/MS)相容。

[0161] 在某些具體實施例中，有興趣的組分為一蛋白質(例如，膜結合蛋白、跨膜性蛋白、I型或II型膜蛋白、受體、酶、一脂蛋白、一糖蛋白)。在某些具體實施例中，蛋白質的構型係在萃取的期間(或藉由萃取的完成)而被改變。

[0162] 在某些具體實施例中，有興趣的組分為一多醣(例如，肝素或肝素衍生多醣)、一多酚(例如，一單寧)、一苯基丙酸類(例如，一木[質]素、一類黃酮)、一維生素、一毒素、一污染物[質]、一脂質{例如，磷脂[例如，卵磷脂(PtdCho)、磷脂醯乙醇胺(PtdEtn)、磷脂醯肌醇(PtdIns)、磷脂醯絲胺酸(PtdSer)]、糖脂、類固醇[例如，雌激素、孕酮、雄激素、睪酮、蛻皮類固醇(諸如，蛻皮固酮)、皮質類固醇激素(諸如，糖皮質[激]素以及鹽皮質[激]素)、促蛋白質合成類固醇、膽固醇、植物固醇、油菜固醇、麥角固醇]}、一薄膜(細胞膜、胞器膜、脂雙層)、存在於一細菌包含體中的一組分、一抗原(例如，來自一細菌)、一病毒(例如，用於疫苗生產者)、一藥學試劑[諸如，一小分子、一代謝物(例

如，一小分子代謝物)、一藥物(例如，一藥學藥物)、一藥物代謝物、一染料、一食品成分、一奈米粒子配方、一脂筏、一澱粉斑塊、微管、細胞溶質或一特定細胞類型。

[0163]在某些具體實施例中，有興趣的組分為一核酸[DNA(核DNA、粒線體DNA)、RNA(信使RNA、轉移RNA、核糖體RNA)]。

[0164]在某些具體實施例中，有興趣的組分為一病毒(例如，HIV；HPV；A、B、C、D、E、F或G型肝炎；巨細胞病毒、愛波斯坦-巴爾病毒、黃熱病等等)或一細菌(例如，革蘭氏陽性或革蘭氏陰性菌、互利共生體細菌、病原細菌)。

[0165]在某些具體實施例中，有興趣的組分為一殺蟲劑[例如，殺菌劑、殺真菌劑、除草劑、殺蟲藥(例如，殺卵劑、殺幼蟲劑或殺成蟲劑)、殺蟎劑、軟體動物殺滅劑、殺線蟲劑、殺鼠劑或殺病毒劑]。

[0166]在某些具體實施例中，有興趣的組分為疏水的。

[0167]在某些具體實施例中，有興趣的組分為親水的。

[0168]在某些具體實施例中，有興趣的組分為親水親油的/兩親的。

[0169]在某些具體實施例中，有興趣的多數組分係從該多數組分中被萃取。在某些具體實施例中，有興趣的多數組分含有一核酸以及一蛋白質。

[0170]在某些具體實施例中，多數組分包含一細胞(例如，原核的或真核生物的)、一胞器(例如，粒線體、核、高爾基體、葉綠體、內質網、液泡、頂體、中心粒、纖毛、

乙醛酸循環小體、氫化酶體、溶酶體、黑素體、線體、肌原纖維、核仁、括弧體、過氧化物酶體、核糖體、微粒體、小泡)、一薄膜、一生物試樣[組織試樣(脂肪組織、肝臟、腎臟、皮膚、胰臟、胃、小腸、大腸、乳房、卵巢、子宮、前列腺、骨骼、腱、軟骨、頭髮、指甲、牙齒、心臟、腦、肺臟、皮膚、活體檢視等等)、血液、尿液、奶、精液、唾液、黏液、其他體液以及固體]、細胞的聚集(例如，血液、精液、黏液、唾液、組織活體檢視)。

[0171]在某些具體實施例中，多數組分具有生物起源。在某些具體實施例中，生物起源的多數組分係來自一動物[例如，哺乳動物的(例如，人或家畜)]、爬蟲類動物、兩棲動物、魚、昆蟲、鳥類、真菌、細菌、病毒或植物。在某些具體實施例中，生物起源的多數組分係來自一古代的試樣，例如，化石(例如，化石動物、化石木材、化石骨骼、化石牙齒、化石糞等等)。

[0172]在某些具體實施例中，多數組分包括一乳膠(例如，乳膠漆、潤滑劑等等)。

[0173]在某些具體實施例中，多數組分為合成/人造(例如，油墨、潤滑劑、乳膠漆、乳劑、洗劑、燃料、液體推進劑、彈性體)。

[0174]在某些具體實施例中，一組分係從固體粒子的懸浮液中被萃取。

[0175]在某些具體實施例中，多數組分包括一乳膠。

[0176]在某些具體實施例中，多數組分包括一脂質或一

在脂質或一脂質混合物中之一或多種組分的溶液。

[0177]在某些具體實施例中，該多數組分進一步包括一蛋白質、脂蛋白、糖蛋白、糖脂、類固醇、維生素、藥物物質或藥物代謝物。在某些具體實施例中，多數組分包含一細胞或一單細胞微生物。

[0178]在某些具體實施例中，該(等)溶劑係自經萃取之有興趣的組分被移除，例如，於有興趣的組分之進一步加工以前。

[0179]在某些具體實施例中，該(等)溶劑係藉由蒸發而被移除[例如，在周圍溫度(例如，約20至約23.5°C)或在升高的溫度(例如，一高於周圍溫度的溫度，例如，約27°C、約30°C、約32°C、約35°C、或約37°C、或大於)]。

[0180]在某些具體實施例中，該(等)溶劑係藉由沈澱有興趣的組分，例如，以及藉由移除溶劑上清液且藉由將其用一選擇的溶劑來替換而被移除。

[0181]在某些具體實施例中，最佳化的鹽濃度可用來選擇地沈澱所欲的蛋白質且將不欲的組分保持在上清液中且反之亦然。例如，此一途徑可用來減少一高度地高豐度蛋白質物種的複合試樣(例如，血清清蛋白、免疫球蛋白等等)且為生物顯著性的低高豐度蛋白質而濃集。

[0182]在某些具體實施例中，該方法係在一介於約-40°C以及約+100°C之間的溫度(例如，-2°C、25°C、70°C)而被進行。

[0183]在某些具體實施例中，該方法係在低滲壓鹽濃度之下被進行。

[0184]在某些具體實施例中，該方法係在高滲壓鹽濃度之下被進行。

[0185]在某些具體實施例中，該方法係在等滲透壓鹽濃度之下被進行。

[0186]在某些具體實施例中，鹽濃度係被改變以選擇性地沈澱一有興趣的組分及/或以維持在溶液中之一污染物。

[0187]在某些具體實施例中，鹽濃度係被改變以選擇性地沈澱一污染物及/或以維持在溶液中之一有興趣的組分。

[0188]在某些具體實施例中，液相係藉由吸移化、淨析化、吸收等等而被物理性分離。

[0189]在某些具體實施例中，液相係使用管柱層析法(吸收的一實施例)而被分離。

[0190]在某些具體實施例中，一試樣(極性相)係被稀釋以在液相的分離之後誘發沈澱。

[0191]在某些具體實施例中，液相係不被分離，試樣係代之以被稀釋以誘發沈澱。

[0192]在某些態樣中，加工可用來毀壞或改變微胞及/或乳膠，特別是當界面活性劑或清潔劑用來幫助在水萃取溶劑中之疏水本體的溶解化作用之時。其中，該等微胞及/或乳膠係在分子本體(例如，來自薄膜、細胞、組織以及複合基質)之萃取的期間被形成。加工的應用[例如，加工(例如，機械加工)的重複應用]可導致微胞以及乳膠的破壞且導致試樣-衍生分子之分配到分開的液相裡，基於其等之物理化學性質。

[0193]在某些具體實施例中，加工步驟包括溫度、微波輻射或機械加工的一或多種。

[0194]在某些具體實施例中，機械加工步驟包括均質化(作用)[例如，物理均質化，例如，珠磨式組織研磨器、聲波破碎、轉子-定子均質機、Dounce均質機、波特(Potter)-均質機]、漩渦化、超音波化、吸移化、剪切(例如，注射器剪切)、研磨(例如，灰泥以及(研)杵研磨)、搖動、混合、摻合、搥打等等的一或多種。在某些具體實施例中，機械加工步驟包括一質量傳送步驟(例如，劇烈混合、機械搖動或搥打)。

[0195]在某些具體實施例中，該方法包括壓力[例如，(諸)壓力週期]與另一(諸)加工類型，例如，溫度、微波輻射或機械加工等等之同時(協同)或交替的應用。

[0196]此外，本發明的揭示內容描述溶劑(例如，一或多種溶劑)以增進試樣-衍生分子本體在溶劑之中的分配之用途且溶劑在周圍壓力以及室溫(例如，約25°C)具有差的互溶度(例如，氯仿係在0.815% w:w用水溶解的，己烷係只在0.001% w:w用水溶解的)。機械加工可改變溶劑的互溶度。藉由選擇適當的溶劑、溶劑的量以及機械加工的量(例如，持續(時間)及/或力)，暫時地將非互溶的溶劑以及將被萃取的試樣混合是可能的，其導致一介穩定混合物的形成，在那裡，產生的可溶性溶劑具有經改變的性質，例如，溶解試樣組分的能力。當部分地解離的化合物係正被分配之時，此一介穩定系統的機械加工之終止或減少引起混合

物的分離成性質不同的部分以及介於溶劑之間的分子本體之分配，根據各個其等個別的物理化學性質(諸如，分配係數， $\log P$ ；或分配係數， $\log D$)(參照，例如，Paternoste等人，Biophys. J. 69：2476-2488 (1995)以及在那裡所舉的參考文獻)。在某些具體實施例中，清潔劑的使用可藉由在萃取的期間使用一些溶劑而被大大地減少或避免。

[0197]再者，本發明的揭示內容描述溶劑之三元以及較高的混合物的用途，兩或多種非互溶的溶劑係以一兩親的溶劑(例如，溶劑)而被添增之處係互溶至一比以任何一個另外非互溶的液相，例如，水以及油，還要大的程度。一兩親的溶劑的存在進一步增強機械加工的能力以改變在相互範圍之內之溶劑的互溶度且，在減少或停止機械加工的時候，以加速正被萃取成性質不同的相之試樣(例如，混合物)的組分之分配。兩親的溶劑不僅可與水相形成穩定結合(由於氫鍵鍵合)而且可與油以及脂質借助於疏水作用形成穩定結合。因此，在某種具體實施例中，藉由機械加工所促進之在兩親的溶劑中多組分試樣的溶解將引起親脂性以及親水化合物之一相分離成兩或多種液相，其中該等液相接著可被機械性分離。

[0198]在一態樣中，本發明揭示內容以一種從多數組分中萃取一有興趣的組分之方法為特色。該方法包括

提供一試樣(例如，混合物)，該試樣含有多數組分以及至少一液相(例如，多數液相)(例如，形成非互溶的液相)；

在試樣(例如，例如，混合物)上進行一第一加工步驟，

造成的形成一懸浮液、一漿體、一乳膠、微胞或一另外的液相；

減少或停止加工步驟，藉此從多數組分[例如，增加在液相之一者中該有興趣的組分之百分比(或比例)]中萃取有興趣的組分。

[0199]在某些具體實施例中，加工步驟包括溫度、微波輻射或機械加工的一或多種。

[0200]在某些具體實施例中，機械加工步驟包括均質化(作用)[例如，物理均質化，例如，珠磨式組織研磨器、聲波破碎、轉子-定子均質機、Dounce均質機、波特(Potter)-均質機]、漩渦化、超音波化、吸移化、剪切(例如，注射器剪切)、研磨(例如，灰泥以及(研)杵研磨)、搖動、混合、摻合、搥打等等的一或多種。在某些具體實施例中，機械加工步驟包括一質量傳送步驟(例如，劇烈混合、機械搖動或搥打)。

[0201]在某些具體實施例中，該方法包括壓力[例如，(諸)壓力週期]與另一(諸)加工類型，例如，溫度、微波輻射或機械加工等等之同時(協同)或交替的應用。

[0202]在一態樣中，本發明揭示內容以一種從多數組分中萃取一有興趣的組分之方法為特色。該方法包括

提供一試樣(例如，混合物)，該試樣含有多數組分以及至少一液相(例如，多數液相)(例如，形成非互溶的液相)；

在試樣(例如，例如，混合物)上進行一第一機械加工步驟，造成的形成一懸浮液、一漿體、一乳膠、微胞或一另外的液相；

減少(降低)或停止機械加工步驟，藉此從多數組分[例如，增加在液相之一者中該有興趣的組分之百分比(或比例)]中萃取有興趣的組分。

[0203]在某些具體實施例中，機械加工步驟包括均質化(作用)[例如，物理均質化，例如，珠磨式組織研磨器、聲波破碎、轉子-定子均質機、Dounce均質機、波特(Potter)-均質機]、漩渦化、超音波化、吸移化、剪切(例如，注射器剪切)、研磨(例如，灰泥以及(研)杵研磨)、搖動、混合、摻合、搥打等等的一或多種。在某些具體實施例中，機械加工步驟包括一質量傳送步驟(例如，劇烈混合、機械搖動或搥打)。

[0204]在某些具體實施例中，該方法包括一機械加工步驟與壓力[例如，(諸)壓力週期]或另一加工類型，例如，溫度或微波輻射等等之同時(協同)或交替的應用。

[0205]在某些具體實施例中，多數組分包括多變化的疏水性之組分。

[0206]在某些具體實施例中，多數組分包括(例如，提供)多數液相之一相。

[0207]在某些具體實施例中，一液相在萃取完成的期間或時候形成一固相。

[0208]在某些具體實施例中，多數組分的一組分為可溶於多數液相之一液相的。

[0209]在某些具體實施例中，多數組分的一組分為不可溶於多數液相之一液相的。

[0210] 在某些具體實施例中，多數組分包括一膠體。如在此所使用的，一膠體或膠態分散體為一用肉眼(看來)似乎是一勻相溶液的不勻相混合物。一不勻相混合物為一兩相的混合物，而一溶液為一相。在一膠體中，分散相係由遍及連續相被均勻的分佈之小粒子或小滴構成。膠體的實施例包括奶、乳劑、霧劑(例如，霧、煙霧、煙)、柏油、油墨、塗料、膠以及海泡沫。

[0211] 在某些具體實施例中，多數組分包含一乳膠。如在此所使用的，一乳膠為一膠體的一種。一乳膠為一兩種非互溶的物質之混合物。一物質(分散相)係被分散於另一種(連續相)之中。乳膠的實施例包括奶油、人造奶油、濃縮咖啡、美奶滋、照相軟片的感光面、用於金屬加工的切削液、塗料、油墨、潤滑劑、局部用藥、洗劑、化妝品製劑等等。在奶油以及人造奶油中，一連續液相環繞水的小滴(油包水乳膠)。

[0212] 在某些具體實施例中，至少兩液相在第一機械加工步驟以前為非互溶。

[0213] 在某些具體實施例中，至少兩液相在進行一機械加工步驟之後為互溶(例如，完全地互溶)。

[0214] 在某些具體實施例中，至少兩液相在機械加工以前為非可溶。

[0215] 在某些具體實施例中，至少兩液相在進行一第一機械加工步驟之後為部分地可溶。

[0216] 在某些具體實施例中，至少兩液相在進行一第一機械加工步驟之後為完全地可溶。

[0217]在某些具體實施例中，第一機械加工步驟係被中止。在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於一第二機械加工步驟，其中該第二機械加工步驟為同第一機械加工步驟一樣的機械加工的類型或為一不同的機械加工步驟的類型。

[0218]在某些具體實施例中，一第二機械加工步驟係被進行且為同第一機械加工步驟一樣的機械加工的類型或為一不同的機械加工步驟的類型。在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於一第三機械加工步驟，該第三機械加工步驟為同第一或第二機械加工步驟一樣的機械加工的類型或為一不同於第一或第二機械加工步驟的機械加工步驟的類型。

[0219]在某些具體實施例中，減少或停止機械加工步驟引起至少兩液相之分離變成分開的相且有興趣的組分係被分配到該等至少兩液相之一者裡。

[0220]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包含一第二容器，該容器包含一試劑。在某些具體實施例中，暴露在第一、第二或第三機械加工步驟之下使第二容器釋出其內含物，藉此將試劑引入試樣(例如，混合物)。

[0221]在某些具體實施例中，多數組分係被分配到一並不包括有興趣的組分(例如，實質上無有興趣的組分)的液相裡。

[0222]在某些具體實施例中，方法進一步包括將有興趣的組分與液相隔絕/純化。

[0223] 在某些具體實施例中，液相係以部分形式而被分離。

[0224] 在某些具體實施例中，經萃取之有興趣的組分係直接地與一下游程序(例如，分析方法，例如，HPLC或LC/MS)相容。

[0225] 在某些具體實施例中，有興趣的組分為一蛋白質(例如，膜結合蛋白、跨膜性蛋白、I型或II型膜蛋白、受體、酶、一脂蛋白、一糖蛋白)。在某些具體實施例中，蛋白質的構型係在萃取的期間(或藉由萃取的完成)而被改變。

[0226] 在某些具體實施例中，有興趣的組分為一多醣(例如，肝素或肝素衍生多醣)、一多酚(例如，一單寧)、一苯基丙酸類(例如，一木[質]素、一類黃酮)、一維生素、一毒素、一污染物[質]、一脂質{例如，磷脂[例如，卵磷脂(PtdCho)、磷脂醯乙醇胺(PtdEtn)、磷脂醯肌醇(PtdIns)、磷脂醯絲胺酸(PtdSer)]、糖脂、類固醇[例如，雌激素、孕酮、雄激素、甾酮、蛻皮類固醇(諸如，蛻皮固酮)、皮質類固醇激素(諸如，糖皮質[激]素以及鹽皮質[激]素)、促蛋白質合成類固醇、膽固醇、植物固醇、油菜固醇、麥角固醇]}、一薄膜(細胞膜、胞器膜、脂雙層)、存在於一細菌包含體中的一組分、一抗原(例如，來自一細菌)、一病毒(例如，用於疫苗生產者)、一藥學試劑[諸如，一小分子、一代謝物(例如，一小分子代謝物)]、一藥物(例如，一藥學藥物)、一藥物代謝物、一染料、一食品成分、一奈米粒子配方、一脂筏、一澱粉斑塊、微管、細胞溶質或一特定細胞類型。

[0227] 在某些具體實施例中，有興趣的組分為一核酸

[DNA (核DNA、粒線體DNA)、RNA (信使RNA、轉移RNA、核糖體RNA)]。

[0228]在某些具體實施例中，有興趣的組分為一病毒(例如，HIV；HPV；A、B、C、D、E、F或G型肝炎；巨細胞病毒、愛波斯坦-巴爾病毒、黃熱病等等)或一細菌(例如，革蘭氏陽性或革蘭氏陰性菌、互利共生體細菌、病原細菌)。

[0229]在某些具體實施例中，有興趣的組分為一殺蟲劑[例如，殺菌劑、殺真菌劑、除草劑、殺蟲藥(例如，殺卵劑、殺幼蟲劑或殺成蟲劑)、殺蟎劑、軟體動物殺滅劑、殺線蟲劑、殺鼠劑或殺病毒劑]。

[0230]在某些具體實施例中，有興趣的組分為疏水的。

[0231]在某些具體實施例中，有興趣的組分為親水的。

[0232]在某些具體實施例中，有興趣的組分為親水親油的/兩親的。

[0233]在某些具體實施例中，有興趣的多數組分係從該多數組分中被萃取。在某些具體實施例中，有興趣的多數組分含有一核酸以及一蛋白質。

[0234]在某些具體實施例中，多數組分包含一細胞(例如，原核的或真核生物的)、一胞器(例如，粒線體、核、高爾基體、葉綠體、內質網、液泡、頂體、中心粒、纖毛、乙醛酸循環小體、氫化酶體、溶酶體、黑素體、線體、肌原纖維、核仁、括弧體、過氧化物酶體、核糖體、微粒體、小泡)、一薄膜、一生物試樣[組織試樣(脂肪組織、肝臟、腎臟、皮膚、胰臟、胃、小腸、大腸、乳房、卵巢、子宮、

前列腺、骨骼、腱、軟骨、頭髮、指甲、牙齒、心臟、腦、肺臟、皮膚、活體檢視等等)、血液、尿液、奶、精液、唾液、黏液、其他體液以及固體]、細胞的聚集(例如，血液、精液、黏液、唾液、組織活體檢視)。

[0235]在某些具體實施例中，多數組分具有生物起源。在某些具體實施例中，生物起源的多數組分係來自一動物(例如，哺乳動物的(例如，人或家畜))、爬蟲類動物、兩棲動物、魚、昆蟲、鳥類、真菌、細菌、病毒或植物。在某些具體實施例中，生物起源的多數組分係來自一古代的試樣，例如，化石(例如，化石動物、化石木材、化石骨骼、化石牙齒、化石糞等等)。

[0236]在某些具體實施例中，多數組分包括一乳膠(例如，乳膠漆、潤滑劑等等)。

[0237]在某些具體實施例中，多數組分為合成/人造(例如，油墨、潤滑劑、乳膠漆、乳劑、洗劑、燃料、液體推進劑、彈性體)。

[0238]在某些具體實施例中，機械加工步驟係在多數組分上被進行不止一次。

[0239]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於經重複之機械加工步驟。

[0240]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)係被暴露於介於約1以及約1000之間的機械加工步驟。

[0241]在某些具體實施例中，相同類型機械加工步驟係被進行。

[0242]在某些具體實施例中，不同機械加工步驟的類型係被進行。下列一或多種之一或多個步驟可被進行：均質化(作用)[例如，物理均質化，例如，珠磨式組織研磨器、聲波破碎、轉子-定子均質機、Dounce均質機、波特(Potter)-均質機]、漩渦化、超音波化、吸移化、剪切(例如，注射器剪切)、研磨(例如，灰泥以及(研)杵研磨)、搖動、混合、摻合以及搥打。

[0243]在某些具體實施例中，多數液相包含一沸液。

[0244]在某些具體實施例中，多數液相包含一按數種特定比例之數種液體的混合物。

[0245]在某些具體實施例中，多數液相為雙相的。

[0246]在某些具體實施例中，多數液相為三相的。

[0247]在某些具體實施例中，多數液相包括一水溶劑(例如，{例如，水或緩衝化合物及/或鹽類的水溶液[諸如，磷酸鹽緩衝劑、磷酸鹽緩衝劑/鹽水、三羥甲基胺基甲烷(Tris)緩衝液、2-(N-嗎啉)-乙基磺酸(MES)緩衝液、N-2-羥乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES)緩衝液、碳酸氫銨等等})。

[0248]在某些具體實施例中，多數液相包括一有機溶劑(一含碳的溶劑)(例如，乙酸、丙酮、乙腈、異丙醇、叔丁醇、二氯甲烷或甲醇)。

[0249]在某些具體實施例中，多數液相包括包括一無機非水溶劑，該溶劑為除水以外的溶劑，非為一有機溶劑(例如，液態氨、液態二氧化硫、硫醯氯、硫醯氯氟、磷醯氯、四氧化二氮、三氯化銻、五氟化溴、氟化氫、純硫酸以及

另一無機酸)。

[0250]在某些具體實施例中，多數液相包括氯仿、四氯乙烯、甲醇、異丙醇、乙醇、另一醇類[例如，氟化醇(例如，1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)、2,2,2-三氟乙醇(TFE)、2-氟乙醇、2,2,3,3-四氟丙-1-醇、1,3-二氟丙-2-醇)]、水、或一脂族烴(己烷、庚烷)、乙腈、甲酸、三氟乙酸、甘油、脂質(例如，甘油三酯、磷脂、(神經)鞘脂類、糖脂土壤(glycolipidsoil))、氟烴、其他鹵化碳、清潔劑的溶液、緩衝液、離液序列高的鹽類及/或其等之混合物。

[0251]在某些具體實施例中，多數液相包括一質子溶劑(例如，水、甲醇、乙醇、甲酸、氟化氫或氨水)。

[0252]在某些具體實施例中，多數液相包括一無質子溶劑(例如，二甲亞砷、二甲基甲醯胺、六甲基偶磷基醯三胺或其等之混合物)。

[0253]在某些具體實施例中，該(等)溶劑係自經萃取之有興趣的組分被移除，例如，於有興趣的組分之進一步加工以前。

[0254]在某些具體實施例中，該(等)溶劑係藉由蒸發而被移除[例如，在周圍溫度(例如，約20至約23.5°C)或在升高的溫度(例如，一高於周圍溫度的溫度，例如，約27°C、約30°C、約32°C、約35°C、或約37°C、或大於)]。

[0255]在某些具體實施例中，該(等)溶劑係藉由沈澱有興趣的組分(例如，藉由水的添加)，例如，以及藉由移除溶劑上清液且藉由將其用一選擇的溶劑來替換而被移除。

[0256]在某些具體實施例中，最佳化的鹽濃度可用來選擇地沈澱所欲的蛋白質且將不欲的組分保持在上清液中且反之亦然。例如，此一途徑可用來減少一高度地高豐度蛋白質物種的複合試樣(例如，血清清蛋白、免疫球蛋白等等)且為生物顯著性的低高豐度蛋白質而濃集。

[0257]在某些具體實施例中，多數組分提供一液相或多數液相。在某些具體實施例中，液相為一脂質、有機溶劑、含水緩衝液、乳膠或固體粒子的懸浮液。在某些具體實施例中，液相係自一固相在機械加工之下而被形成[例如，一或多種液相為一組分(例如，冰)，其具有一熔融溫度高於萃取程序之溫度(例如，低於0°C)]。一旦一機械加工步驟係在試樣(例如，混合物)上被進行，一相轉移發生且具有一熔融溫度高於萃取程序之溫度的組分(例如，冰)熔化變為一液相。

[0258]在某些具體實施例中，該方法係在低滲壓鹽濃度之下被進行。

[0259]在某些具體實施例中，該方法係在高滲壓鹽濃度之下被進行。

[0260]在某些具體實施例中，該方法係在等滲透壓鹽濃度之下被進行。

[0261]在某些具體實施例中，鹽濃度係被改變以選擇性地沈澱一有興趣的組分及/或以維持在溶液中之一污染物。

[0262]在某些具體實施例中，鹽濃度係被改變以選擇性地沈澱一污染物及/或以維持在溶液中之一有興趣的組分。

[0263]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包括一清潔劑(例如，SDS)。

[0264]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)為無或實質上無清潔劑。

[0265]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包括礦油。

[0266]在某些具體實施例中，試樣(例如，混合物)包括一緩衝液[例如，磷酸鹽緩衝液(PBS)]。

[0267]在某些具體實施例中，一蛋白質係從一生物薄膜中被萃取。

[0268]在某些具體實施例中，一蛋白質係從一脂質相中被萃取。

[0269]在此所描述的方法之一實施例如下。使用在此所描述的方法，一蛋白質、一核酸或一脂質可從脂肪組織、腦、神經、奶油、乳脂等等中被萃取。一組成可從一乳膠或固體粒子的懸浮液[諸如，一藥學或化妝品配方(軟膏、洗劑、乳劑、洗髮精、潤髮液、奈米粒子藥物配方等等)]被萃取。一組成可從一取片劑、膠囊或膠囊錠形式形狀之藥學配方被萃取。一成分可從一多相組分物[諸如，乳膠或固體粒子的懸浮液(例如，油墨、塗料、噴漆、潤滑劑、燃料、用於化學合成的成份等等)、脂質體的懸浮液、膜囊等等]被萃取。油、萜及/或其他親脂性化合物可從植物材料中被萃取。數種化合物(例如，生物鹼、類黃酮、異黃酮、原花色素、花色素苷)可從植物中被萃取(例如，藥用植物)。食

物調味劑成分(例如，辣椒素)可從食物製備中被萃取。一脂溶性維生素(例如，一生育酚、類胡蘿蔔素、蕃茄紅素等等)可從植物油或動物脂肪中被萃取。局部藥物配方組成可從皮膚以及深部組織中被萃取。

[0270]在某些具體實施例中，一染料係從塗料中被萃取。

[0271]在某些具體實施例中，一組分係從土壤中被萃取。

[0272]在某些具體實施例中，一組分係從固體粒子的懸浮液中被萃取。

[0273]在某些具體實施例中，多數組分包括一乳膠。

[0274]在某些具體實施例中，多數組分包括一脂質或一在脂質或一脂質混合物中之一或多種組分的溶液。

[0275]在某些具體實施例中，多數組分進一步包括一蛋白質、脂蛋白、糖蛋白、糖脂、類固醇、維生素、藥物物質或藥物代謝物。在某些具體實施例中，多數組分包含一細胞或一單細胞微生物。

[0276]在某些具體實施例中，該方法分配在多數液相之中多數組分，該方法包括

提供一試樣(例如，混合物)，其中該試樣(例如，混合物)包含多數組分以及多數液相，其中該多數液相係被分級分離；

在試樣(例如，混合物)上進行一第一機械加工步驟，其中機械加工增加多數液相的互溶度，藉此將差的互溶度之

多數液相混合且引起一介穩定混合物的形成；以及

在試樣(例如，混合物)上進行一第一機械加工步驟，藉此減少液相的溶解度且造成多數液相的分離成部分以及引起在多數液相之中之組分的分配。

[0277]在某些具體實施例中，多數液相在周圍溫度具有差的互溶度。

[0278]在某些具體實施例中，本發明的揭示內容提供一從多數組分中萃取一有興趣的組分的方法。該方法包括：

提供一試樣(例如，混合物)，該試樣包括多數組分以及多數液相，其中該試樣(例如，混合物)(wherein the sample (e.g., mixture))；

在試樣(例如，混合物)上進行一第二機械加工步驟，其中第二機械加工步驟為一不同於第一機械加工步驟的機械加工的類型且在多數液相中之至少兩液相變得部分地互溶，造成一具有經改變的性質之混合液相且導致一至少一組分的溶解；以及

在試樣(例如，混合物)上進行一第三機械加工步驟，其中第三機械加工步驟為一不同於第一或第二機械加工步驟的機械加工的類型且其中在試樣(例如，混合物)上進行第三機械加工步驟引起從多數組分之有興趣的組分之分離，藉此從多數組分中萃取有興趣的組分。

[0279]在某些具體實施例中，含有多數組分之產生的液相係以部分形式而被分離。

[0280]在某些具體實施例中，(諸)液相包括一溶劑。

[0281]在某些具體實施例中，含有該(等)有興趣的蛋白質之產生的液相(例如，有機相)可直接地被分析或溶劑可被移除用於含有該(等)有興趣的蛋白質之液相的進一步加工。

[0282]在某些具體實施例中，溶劑可藉由蒸發而被移除[例如，在周圍溫度(例如，約20至約23.5°C)或在升高的溫度(例如，一高於周圍溫度的溫度，例如，約27°C、約30°C、約32°C、約35°C、或約37°C、或大於)]。

[0283]在某些具體實施例中，溶劑可藉由沈澱有興趣的(諸)蛋白質、藉由移除溶劑上清液且藉由將其用一選擇的溶劑來替換而被移除。

[0284]在某些具體實施例中，最佳化的鹽濃度可用來選擇地沈澱所欲的蛋白質且將不欲的組分保持在上清液中且反之亦然。例如，此一途徑可用來減少一高度地高豐度蛋白質物種的複合試樣(例如，血清清蛋白、免疫球蛋白等等)且為生物顯著性的低高豐度蛋白質而濃集。

[0285]在此所描述之方法的其他特質包括：

在某些具體實施例中，本發明的揭示內容提供一蛋白質萃取方法，在那裡，壓力週期用來便於試樣溶解。一試樣可含有蛋白質及/或脂質(諸如，甘油三酯、磷脂、糖脂、(神經)鞘脂類等等)或其他疏水化合物，例如，脂肪酸、脂族烴等等。

[0286]在某些具體實施例中，一試樣可含有一或多種蛋白質。

[0287]在某些具體實施例中，一試樣可含有一或多種脂質。

[0288] 在某些具體實施例中，一試樣可含有或為一片脂肪組織。

[0289] 在某些具體實施例中，一試樣可含有或為一腦組織。

[0290] 在某些具體實施例中，一試樣可含有或為一乳膠、懸浮液或膠體。

[0291] 在某些具體實施例中，一試樣可含有或為奶、一奶製品、樹汁液等等。

[0292] 在某些具體實施例中，一試樣可含有或為塗料、一工業潤滑劑、一化妝品，例如，乳劑或洗劑。

[0293] 在某些具體實施例中，溶解係藉由機械加工而被促進，例如，機械均質化；超音波細胞破壞；攪拌；混合；玻璃、陶瓷或金屬珠的衝擊；研磨或摻合。

[0294] 在某些具體實施例中，一液相含有或為HFIP、TFE、PFOA、2,2,2-三氯乙醇、三氟乙酸或其他鹵代醇或酸。

[0295] 在某些具體實施例中，一液相含有或為其他有機溶劑(例如，如在此所描述的)。

[0296] 在某些具體實施例中，一液相含有或為水或含水緩衝液(例如，被和一有機溶劑混合者)。

[0297] 在某些具體實施例中，一液相含有或為一些在此所描述的溶劑之一混合物。

[0298] 在某些具體實施例中，分配係藉由靜止保溫(例如，分佈在從-20到+50°C的溫度範圍內)而被完成。

[0299] 在某些具體實施例中，分配係藉由離心[分離][例

如，相對離心力：分佈在從1xg (例如，無自轉)到40,000xg的範圍內]而被促進。

[0300]在某些具體實施例中，分配係藉由一疏水液態試劑(例如，油、脂質、礦油、脂族烴等等或其等之一混合物)至試樣的添加以加速相分離而被促進，若試樣-衍生疏水材料不足以形成一層。

[0301]在某些具體實施例中，分配係藉由以上所描述方法之任何組合而被完成。

[0302]在某些具體實施例中，試樣溶解發生，但無分配被觀察到(例如，不夠脂質存在)。

[0303]在某些具體實施例中，至少一液相係在試樣溶解之後被形成。

[0304]在某些具體實施例中，液相係藉由吸移化、濾析化、吸收等等而被物理性分離。

[0305]在某些具體實施例中，液相係使用管柱層析法(吸收的一實施例)而被分離。

[0306]在某些具體實施例中，一試樣(極性相)係被稀釋以在液相的分離之後誘發沈澱。

[0307]在某些具體實施例中，液相係不被分離，試樣係代之以被稀釋以誘發沈澱。

[0308]用語“互溶的”或“互溶性”表示以按所有比例混合形成一勻相溶液之液體的性質。水以及乙醇，例如，按所有比例為互溶的。物質則被認為是“非互溶的”或“不互溶的”，若按任何比例，他們並不形成一溶液時。

[0309]用語“可溶”或“溶解度”表示一物質以溶解在另一者中的能力。物質則被認為是“不溶解”或“不可溶”或“貧乏地可溶”，若一物質並不能夠被溶入其他物質，例如，至少約90% (以重量計)、約92%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%物質為不可溶(並不能夠被溶解)。物質則為“完全地可溶”，若一物質能夠被溶入其他物質，例如，至少約90% (以重量計)、約92%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%物質為可溶。物質則為“部分地可溶”，若一物質能夠在其他物質中被溶解至一程度，例如，至少約10% (以重量計)、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%或在約90%以內物質為可溶。

[0310]一固體具有一定體積以及形狀。

[0311]一液體具有一定體積，但能夠變化其形狀，例如，藉由流動。

[0312]氣體不具有定體積或形狀。

[0313]所有在此所所舉的專利、專利申請案以及參考文獻係特此全面地被併入以為參考。在衝突的情況下，本申請案核對標準。

[0314]本發明之一或多個具體實施例的細節係被陳述於附圖以及在下述的敘述中。本發明其他特質、標的以及優點從陳述與圖示且從申請專利範圍將為明顯的。

【圖式簡單說明】

[0315] 第1A與第1B圖為說明壓力週期的圖。

[0316] 第2圖為一描繪一元件的圖解，該元件可用來作組分以及溶劑的分配。

[0317] 第3圖為一表示液液分配的圖解，該液液分配係藉由壓力循環而被作為引起媒介。

[0318] 第4圖為一直線圖形，該圖形顯示作為於在此所描述的方法中細胞數量的函數之DNA回收。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

[0319] 一試樣(例如，一複合生物試樣)之數種組分的萃取與隨後的分析對藥學發展、診斷以及生物醫學與環境研究為重要的。

[0320] 許多分析方法使用正被分析之分子本體的一溶液，然而，許多試樣(例如，大多數生物試樣)在膠體、凝膠、數種非互溶的化合物(諸如，脂質、蛋白質、核酸、小分子本體等等)之高度地組織化及/或區域化混合物形態下存在。一般，此等複合系統含有具有種類繁多的物理化學性質(諸如，在一特定溶劑中之溶解度或互溶性、疏水性、靜電電荷、大小以及構型)的分子本體。該等分子本體的某些(例如，細胞質、液泡、胞器)係由脂質障壁(諸如，生物性膜)所圍繞，而其他(例如，膜蛋白、脂筏)係被包埋在脂質中。

[0321] 通常，分子本體物理化學性質的變化導致在一給定的萃取溶劑中某些種類分子本體之不適宜的回復。例

如，含水萃取緩衝液可回復細胞質的某些組成(諸如，可溶性蛋白質以及小分子)，然而留下疏水性膜蛋白以及脂質。

[0322] 本揭示內容描述萃取的方法且，在某些情況下，自源(諸如，細胞以及組織)之分子本體的溶解。萃取係基於化學試劑的選擇。可影響萃取的因素包括下列的一或多個：溶劑的選擇、緩衝液的選擇、多相混合物(例如，非互溶的試劑者(諸如，液體、氣體或固體)的選擇、反應溫度以及清潔劑的選擇。在某些具體實施例中，試劑係配合壓力的週期(例如，液體靜壓力)而被使用。可影響萃取的因素亦可包括下列的一或多個：最大壓力、最小壓力、壓力週期的數目以及壓力週期的長度。在某些具體實施例中，試劑係配合機械加工而被使用。可影響萃取的因素亦可包括下列的一或多個：所使用機械加工的種類、機械加工的持續(時間)、所施加機械加工的強度等等。

[0323] 在此所描述的方法之特質：

- 應用少或無界面活性劑或清潔劑的萃取；
- 與下游分析應用(諸如，液相層析法、電泳以及質譜法)的直接相容性；
- 疏水性蛋白之較高的回收率(及/或較好的品質產量)；
- 從含有大量脂質的試樣(例如，脂肪組織或腦組織)或一富於生物薄膜的試樣中之疏水性分子的更完全萃取；
- 多過一分子本體種類(例如，蛋白質、脂質、核酸以及小分子代謝物；殺蟲劑以及濫用的藥物、藥物製劑；奈

米粒子配方；食品成分等等)的一步萃取；

- 用於試樣處理以及分級分離的簡便方式；
 - 允許任何人從非藉由慣用方法可萃取的試樣中萃取被分析物之擇其一的分級分離技術；
 - 允許任何人測定是否慣用方法未能從試樣中萃取某種被分析物之擇其一的分級分離技術；
 - 氟化醇及/或其他兩親的溶劑或其等之組合使一一次萃取試劑可以產生作為兩性質不同的部分之一脂質萃取物以及一極性萃取物；
 - 壓力循環便於組織均質化以及部分之順利的分離；
- 以及
- 方法可便於控制微胞形成且提供步驟以形成或改質膠體、奈米粒子、具所欲特性的乳膠。

壓力

[0324] 液體靜壓力(例如，壓力循環)可用來改變以混合物形式(例如，共沸混合液、溶液、懸浮液或多相混合物)之溶劑的互溶度或互溶性；以控制在微胞、乳膠、凝膠或膠體中之分子的排列；及/或以控制在另一組分或溶劑中多相混合物之一或多種組分的溶解。在壓力上的變化可導致在組分的互溶度上之變化且系統降壓引起混合物分為多相，藉此把分子分離成基於物理化學性質的分開的相。

[0325] 液體靜壓力可藉由以下用來製備膠體或奈米物質：將組分溶入一溶劑、把第一溶劑和另一溶劑混合，當第一溶劑為在大氣壓力之下時，藉此導致非互溶的多相混

合物之形成。壓力亦可用來控制在一多相系統或乳膠中微粒的大小以改變其物理性質或穩定性。

[0326] 壓力可以，例如，液壓或氣壓形式而被施加。

[0327] 一壓力週期為將一試樣暴露於多過一壓力在各別壓力歷經一段時間的總和，例如，提升壓力與減低壓力，例如，從一第一壓力上升至一第二壓力且，然後，從第二壓力降到一第三壓力。再者，一第二壓力可，例如，從第三壓力至一第四壓力至一第五壓力等等，而被進行。此程序可被重複。例如，一壓力週期可由下列組成：將一試樣(例如，正被暴露於壓力週期的混合物，例如，含有一有興趣的組分之混合物)暴露於一第一壓力歷經一第一時間時期且將一試樣暴露於一第二壓力歷經一第二時間時期，然後，以及將一試樣暴露於一第三壓力歷經一第三時間時期。然而，對試樣可被暴露之壓力的數目並沒有限制且在各別壓力所花費的時間時期並不必要為相同。壓力週期的實施例係被提供於第1A圖以及第1B圖中。如在第1B圖中所說明的，一試樣係被暴露於一第一壓力歷經一段時間(t_1)。然後，試樣係被暴露於一第二壓力歷經一段時間(t_2)。然後，試樣係被暴露於一第三壓力歷經一段時間(t_3)。試樣可被暴露於數種壓力歷經數種時間時期(t_n)。這些暴露在各別壓力之下歷經各別時間時期的總和為一壓力週期。在某些具體實施例中，試樣係被暴露於一大於第一或第二壓力之壓力歷經一段時間(在第1B圖中作為 t_{n-1} 而被說明)。暴露在此壓力之下可，例如，藉由破裂一含有此試劑的第二容器

而把(諸)試劑摻入正被暴露於壓力週期的混合物或一室(例如，含有正被暴露於壓力週期之混合物的室)。

[0328]待被使用的最大壓力可介於約100Mpa至約1,000Mpa之間，例如，約100Mpa至約900Mpa、約200Mpa至約800Mpa、約300Mpa至約700Mpa、約400MPa 至約600Mpa、約100MPa至約350Mpa、約250MPa至約500Mpa。例如，最大壓力可從約15至約35 kpsi (35 kpsi= 235 mPa)、或約80 kpsi (537 MPa)、或約30 kpsi、或約240 Mpa。

[0329]待被使用的最小壓力可介於約133Pa至約200Mpa之間，例如，約150Pa至約150Mpa、約200Pa至約100Mpa、約350Pa至約75Mpa、約500Pa至約50MPa、750Pa至約35MPa、約1MPa至約25MPa、約1kPa至約1MPa、約25kPa至約250kPa、約50kPa至約500kPa、約100kPa至約300kPa、約250kPa至約750kPa、約1MPa至約100MPa、約25MPa至約200MPa、約50MPa至約100MPa、約100MPa至約200MPa、約135Pa至約500Pa、約150kPa、約100MPa。在某些具體實施例中，所使用的最小壓力為在海平面的大氣壓力，例如，約100 kPa (例如，0.1 MPa)例如，101.3kPa。

[0330]在某些具體實施例中，所選擇的最大以及最小壓力係基於在壓力值上提供一最小以及最大差異。例如，最小以及最大壓力相差不多於200 MPa。作為另一實施例，最小以及最大壓力相差不少於100 kPa。

[0331]所使用之壓力週期的數目[例如，壓力係被提升且接著被減低的次數，例如，壓力係被從一第一值轉換成

一第二值成一第三值(例如，亦即低於第二值)的次數]亦爲一影響萃取的因素。例如，壓力週期的數目可分佈在從約1個週期到約1000個週期的範圍內，例如，從約5個週期到約800個週期、從約10個週期到約500個週期、從約20個週期到約250個週期、從約30個週期到約150個週期、從約50個週期到約100個週期、從約100個週期到約300個週期、從約200個週期到約400個週期、從約50個週期到約150個週期、從約5個週期到約35個週期、從約10個週期到約25個週期。在某些具體實施例中，壓力從一第一壓力至一第二壓力(例如，亦即高於第一壓力)至一第三壓力(例，亦即低於第二壓力；第三壓力可不像第一壓力一樣的)等等循環。在這些具體實施例中，三種(或更多)壓力全部係作爲週期的部分而被包括。

[0332] 壓力週期的長度[被花費在週期上的時間總數量，即，被花費在第一壓力的時間數量加上被花費在第二壓力的時間數量、加上被花費在任何另外的(諸)壓力的時間數量(例如，在一第三壓力、一第四壓力等等)]亦爲重要的。例如，週期的長度可爲從約5秒鐘至約60分鐘，例如，約10秒鐘、約20秒鐘、約30秒鐘、約45秒鐘、約60秒鐘、約2分鐘、約3分鐘、約4分鐘、約5分鐘、約6分鐘、約7分鐘、約8分鐘、約9分鐘、約10分鐘、約11分鐘、約12分鐘、約15分鐘、約20分鐘、約25分鐘、約30分鐘、約35分鐘、約40分鐘、約45分鐘、約50分鐘、約55分鐘、約60分鐘。在許多具體實施例中，在第一和第二壓力的時間長度是相同

的。例如，在一20秒鐘的週期，混合物係在第一壓力歷經10秒鐘且在第二壓力歷經10秒鐘。

[0333] 被花費在一給定的壓力位準(例如，在第一或第二或第三壓力)的時間長度可為，例如，從約5秒鐘至約30分鐘，例如，約10秒鐘、約20秒鐘、約30秒鐘、約45秒鐘、約60秒鐘、約2分鐘、約3分鐘、約4分鐘、約5分鐘、約6分鐘、約7分鐘、約8分鐘、約9分鐘、約10分鐘、約11分鐘、約12分鐘、約15分鐘、約20分鐘、約25分鐘、約30分鐘。在許多具體實施例中，在第一以及第二壓力的時間長度是相同的。例如，在一20秒鐘的週期，混合物係在第一壓力歷經10秒鐘且在第二壓力歷經10秒鐘。

[0334] 基於溶劑以及多數組分之組成物的性質，至一特定壓力位準之下的暴露可能需要被最佳化。因此，被花費在一壓力的時間長度可能需要比被花費在其他(諸)壓力的時間為長。在某些具體實施例中，混合物可為在各別壓力歷經一不同的時間量。例如，混合物可在第一壓力歷經10秒鐘且在第二壓力歷經30秒鐘。

[0335] 壓力週期進一步的實施例如下：

在海平面的大氣壓力(101.3 KPa)起始，再加上在100 MPa被停留歷經5秒鐘且在海平面的大氣壓力(101.3 KPa)被停留歷經30秒鐘，20個週期；

在海平面的大氣壓力(101.3 KPa)起始，再加上在240 MPa被停留歷經20秒鐘且在海平面的大氣壓力(101.3 KPa)被停留歷經20秒鐘，50個週期；以及

在100MPa起始，再加上在413 MPa被停留歷經10秒鐘，再加上在200 Mpa被停留歷經10秒鐘，再加上在100 MPa被停留歷經10秒鐘，此順序係被重複10個週期以上。

[0336]在某些使三種壓力捲入週期的具體實施例中，壓力週期的長度為被花費在第一、第二以及第三週期的時間總數量。

[0337]壓力循環參數的實施例包括：五個在35 kpsi之一分鐘的週期，在那裡，壓力係在241 MPa被保持30秒鐘，再加上在大約101.3 KPa (大氣壓力)30秒鐘；20個週期，在那裡，在各個週期內，被停留在一100 MPa的壓力歷經5秒鐘且被停留在大氣壓力(101.3 KPa)歷經30秒鐘；30個週期，在那裡，壓力係被維持在500 MPa歷經10秒鐘，再加上，在200 MPa歷經20秒鐘的步驟，然後再加上在100 MPa 30秒鐘，對各個壓力週期造成1分鐘。

加工步驟

[0338]加工(諸如，機械加工)可，例如，配合在此所描述的溶劑及/或配合一壓力變化而被使用以改變在混合物(例如，共沸混合液、溶液、懸浮液或多相混合物)中的試樣組分及/或溶劑的溶解度或互溶性；以控制在微胞、乳膠、凝膠或膠體中之分子的排列；及/或以控制在另一組分或溶劑中多相混合物之一或多種組分的溶解。下列系統的機械加工組分可分離成多相，藉此將分子基於物理化學性質分配成分開的相。

[0339]加工(諸如，機械加工)可，例如，配合在此所描

述的溶劑及/或配合一壓力變化而被使用以藉由將組分溶解於一溶劑中及/或將第一溶劑與另一溶劑混合而製備一懸浮液、一漿體、一乳膠、微胞、一另外的液相、膠體或奈米物質s，藉此導致非互溶的多相混合物之形成。

[0340]加工的實施例包括：溫度、微波輻射以及機械加工。

[0341]機械加工的實施例包括：均質化(作用) [例如，物理均質化，例如，珠磨式組織研磨器、聲波破碎、轉子-定子均質機、Dounce均質機、波特(Potter)-均質機]、漩渦化、超音波化、吸移化、剪切(例如，注射器剪切)、研磨(例如，灰泥以及(研)杵研磨)、搖動、混合、摻合、搥打等等。機械加工可包括一質量傳送步驟(例如，劇烈混合、機械搖動或搥打)。

[0342]加工(諸如，機械加工)可被控制及/或被調整。變數包括：加工的持續(時間)；加工步驟係被重複的次數；加工步驟的強度(例如，所施加至試樣的力)；在加工係被進行的溫度等等。

[0343]一或更多類型的加工(諸如，機械加工)可以一在此所提供的方法而被使用。再者，一或更多類型的加工(諸如，機械加工)可與於一在此所提供的方法中之壓力循環而被組合。

溫度

[0344]在萃取方法係被進行的溫度亦可影響程序。溫度可增加試樣(例如，生物性膜)的無秩序且便於一有興趣的分子本體(例如，組分)的萃取。

[0345] 例如，萃取方法可以在介於約-40 °C至+100 °C之間被進行，例如，從約-20°C至約70°C、從約0°C至約50°C、從4°C至約37°C、從約10°C至約30°C、從約15°C至約25°C、在約20°C、在約23°C、在約25°C、在約70°C或在約-2°C。

[0346] 用於在方法中使用之溫度的選擇可藉由溶劑以及試樣組分的性質而被影響。溫度可藉由改變(增加或減少)在1°C之差的溫度中而被最佳化。在方法係被進行的溫度可，例如，藉由一循環水浴而被調節。

[0347] 萃取方法亦可使得溫度以及壓力在各個週期內變化而被進行，因為溫度變化進一步改變溶劑以及試樣組分的互溶度，即，溫度和壓力可被協同地使用。例如，於在週期中的第一壓力，試樣(混合物)係在一第一溫度；在週期的第二壓力，試樣(混合物)係在一第二溫度。在某些具體實施例中，第一溫度係高於第二溫度。在其他具體實施例中，第二溫度係高於第一溫度。

[0348] 萃取方法亦可使得溫度因加工(諸如，機械加工)而異而被進行，因為溫度變化進一步改變溶劑以及試樣組分的互溶度，即，溫度和機械加工可被協同地使用。例如，在加工(諸如，機械加工)以前，試樣(混合物)係在一第一溫度；在加工(諸如，機械加工)的期間，試樣(混合物)係在一第二溫度。在某些具體實施例中，第一溫度係高於第二溫度。在其他具體實施例中，第二溫度係高於第一溫度。

液體

[0349] 種類繁多的液體可被使用於在此所提供的萃取

方法之液相中。例如，溶劑、清潔劑、緩衝液、離液序列高的試劑(例如，離液序列高的鹽類)以及其等之混合物可被使用。

溶劑

[0350]種類繁多的溶劑可被應用於在此所描述的萃取方法中。例如，該(等)溶劑可為水、有機或脂質的。溶劑系統可形成多相混合物(例如，非互溶的試劑的)，例如，系統可為雙相的或三相的。

[0351]在較佳的具體實施例中，至少兩溶劑相(例如，液相)係被使用且至少兩溶劑相在壓力週期的壓力之一者非為互溶(例如，溶劑相在第一壓力非為互溶)。然而，在壓力循環的時候，兩溶劑相變得在其他壓力(例如，在第二壓力，在那裡，第二壓力係大於第一壓力)至少部分地互溶(且在某些情況下，部分地可溶)。在返回第一壓力時(或轉移到低於第二壓力之第三壓力)，部分相互互溶性係損失且溶劑相分離。在某些具體實施例中，取決於所使用溶劑相的選擇，溶劑相在第二壓力可變得完全地互溶(且在某些情況下，完全地可溶)。

[0352]在其他較佳的具體實施例中，至少兩溶劑相(例如，液相)係被使用且至少兩溶劑相在加工(諸如，機械加工)以前非為互溶(例如，溶劑相非為互溶)。然而，因加工(諸如，機械加工)，兩溶劑相變得至少部分地互溶(且在某些情況下，完全地可溶)。因加工(諸如，機械加工)的終止[或一加工(諸如，機械加工)的減少]，部分相互互溶性係損失且

溶劑相分離。在某些具體實施例中，取決於所使用溶劑相的選擇，溶劑相因加工(諸如，機械加工)可變得完全地互溶(且在某些情況下，完全地可溶)。

[0353] 溶劑的實施例包括下列：乙酸、丙酮、乙腈、苯、1-丁醇、2-丁醇、2-丁酮、叔-丁醇、四氯化碳、氯(代)苯、氯仿、環己烷、1,2-二氯乙烷、二乙醚、二甘醇、二甘醇二甲醚、1,2-二甲氧基乙烷(甘醇二甲醚，DME)、二甲醚、二甲基甲醯胺(DMF)、二甲亞砷(DMSO)、二噁烷、乙醇、乙酸乙酯、1,2-亞乙基二醇、甘油、庚烷、六甲基磷醯胺(HMPA)、六甲替亞磷醯三胺(HMPT)、己烷、甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE)、二氯甲烷、N-甲基-2-吡咯酮(NMP)、硝基甲烷、戊烷、石油醚、1-丙醇、2-丙醇、吡啶、四氫呋喃(THF)、甲苯、三乙胺、水、重水(D₂O)、鄰二甲苯、間二甲苯、對二甲苯以及其等之混合物。

[0354] 溶劑亦可分成質子或無質子類。質子溶劑的實施例包括下列：水、甲醇、乙醇、甲酸、氟化氫以及氨水。無質子溶劑的實施例包括下列：二甲亞砷、二甲基甲醯胺、六甲基偶磷基醯三胺以及其等之混合物。

[0355] 在此所描述的任何溶劑的混合物亦可被使用。

[0356] 可用於實施此揭示內容之方法的溶劑之非限定的實施例包括下列：氯仿、四氯乙烯、甲醇、異丙醇、乙醇、水、脂族烴(例如，己烷、庚烷)、乙腈、甲酸、三氟乙酸、甘油、一脂質[例如，甘油三酯；磷脂；(神經)鞘脂類；糖脂土壤(glycolipidsoil)，例如，來自試樣本身，例如，來

自一生物性膜(例如，脂膜；脂雙層)]、或水溶液[例如，起源於試樣本身的(諸)脂質組分，例如，來自一生物性膜或細胞質]、一氟烴、其他鹵化碳、二甲亞砜(DMSO)、氟化醇(例如，兩親的氟化醇) [例如，1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)、2,2,2-三氟乙醇(TFE)、2-氟乙醇、2,2,3,3-四氟丙-1-醇、1,3-二氟丙-2-醇、全氟辛醇)、其他醇類以及其等之混合物。在某些具體實施例中，一試樣(例如，組分的源)提供一溶劑(例如，起一溶劑的作用)。在某些情況下，來自試樣的此溶劑構成萃取系統的液相之一者。例如，在一膜蛋白的萃取中，在適當的條件之下，脂雙層在萃取方法中作為一溶劑且作為一液相(例如，膜蛋白係被溶入脂雙層)。

[0357] 溶劑的濃度可被最佳化。濃度的實施例包括：約0.2M HFIP；約0.05M HFIP；約0.38M至約0.57M HFIP；約60% HFIP；約75% HFIP；約95% HFIP；約100% HFIP；約1%至約5%甲酸。溶劑可在數種其他溶劑(例如，乙腈)或緩衝液[例如，磷酸鹽緩衝溶液(PBS)]中被配製。溶劑可單獨地被使用以於在此所描述的方法中構成一相。交替地，一溶劑(例如，在此所列入的一溶劑)可為一與其他組分(例如，一脂質，例如，其他溶劑)配製一溶劑相的溶劑。例如，50%乙腈與0.1%甲酸可配製一溶劑相，如在此實施例中所說明的。

[0358] 一單溶劑相可包括一溶劑的組合。例如，一溶劑相可為以一2：5：2或4：4：1(w：w：w)比例之氯仿：甲醇：水；或以一1：1(w：w)比例之甲醇：氯仿。作為另一

實施例，50%乙腈與0.1%甲酸可被用作一溶劑相。

[0359] 溶劑可包括一共沸液或，當溶劑相係被暴露於增加的(例如，第二)壓力之時，一可形成的共沸液。然而，溶劑混合物的共沸性質已經主要地在蒸餾的應用中被研究，因為一產生的共沸液之沸騰溫度係不同於其等成份溶劑的沸點，共沸混合液藉由呈現經改變的溶解度以及溶解其他化合物的能力而作為不同的溶劑。液體靜壓力改變共沸溶劑混合液的性質，正如其改變個別溶劑的性質。可存在於一溶劑相中或可暴露在第二壓力之下形成之共沸液的實施例包括下列：95.5%乙醇以及4.5%水(w : w)；20.2%氯化氫以及79.8%水(w : w)；1.2%水以及98.8%二乙醚(w : w)；20%丙酮以及80%氯仿(w : w)；30%丙酮、47%氯仿以及23%甲醇(w : w : w)。

[0360] 在某些具體實施例中，一或多種溶劑可被加到一試樣(例如，用於萃取之組分的源)且此導致兩或多種液相的形成。例如，一溶劑[例如，一兩親物(諸如，HFIP)]至一含有一或多種親水及/或極性組分以及一或多種脂質之試樣的添加引起具一或多種親水及/或極性組分以及一或多種脂質之穩定混合物的形成[例如，至一增加的壓力位準之下的暴露或在加工(諸如，機械加工)時]。當壓力係被增加或加工(諸如，機械加工)的終止[或一加工(諸如，機械加工)的減少]之時，一或多種親水及/或極性相(例如，HFIP)以及一或多種脂質分離成兩或多種液相，例如，藉此導致組分之分離成親水及/或極性或脂質相，例如，導致一有興趣的

組分之分離。在某些較佳的具體實施例中，一溶劑係被加到一試樣(例如，用於萃取之組分的源)且此導致兩或多種液相的形成，例如，試樣提供(諸)溶劑(例如，液相)。例如，一溶劑[例如，一兩親物(諸如，HFIP)]至一含有水以及脂質之試樣的添加引起具水以及脂質之穩定混合物的形成[例如，至一增加的壓力位準之下的暴露或在加工(諸如，機械加工)時]。當壓力係被增加或加工(諸如，機械加工)的終止[或一加工(諸如，機械加工)的減少]之時，水(例如，以及HFIP)以及脂質分離成兩或多種液相，例如，藉此導致組分之分離成水以及脂質相，例如，導致一有興趣的組分之分離。

[0361]在某些具體實施例中，一有機溶劑(例如，一揮發有機溶劑)(例如，HFIP)可能需要被移除。例如，一揮發有機溶劑的移除可藉由蒸發而實行。在某些具體實施例中，揮發有機溶劑的移除可藉由該(等)有興趣的組分之沈澱而實行。接著，剩下的溶劑可從產生的沈澱物(pellet)被分開。沈澱可從一溶劑(例如，HFIP)藉由適當組分(例如，一水溶液)的添加而實行。沈澱效率可藉由試樣濃度、溫度、pH值、時間、壓力以及其他溶質(例如，鹽類、離液序列高的試劑、清潔劑或其他組分)的添加而被改善。

緩衝液

[0362]種類繁多的緩衝液可與在此所描述的萃取方法而被使用。例如，PBS可在本方法之一溶劑相中被使用。種類繁多的緩衝液可用來維持一萃取溶劑之一所欲的pH值以

及維持在一特定溶劑中之所欲組分的溶解度與具一隨後的分析方法之相容性。此等緩衝液的實施例包括下列：HEPES、TRIS、MES、碳酸氫銨、乙酸銨、甲酸、三氟乙酸、乙酸等等。

[0363]鹽類的數種濃度在細胞材料之選擇性萃取的期間可用來控制滲透壓力。例如，0.9%氯化鈉可用於從哺乳動物的細胞中之種組分的萃取中。滲透壓力可在壓力循環的應用中與加工(諸如，機械加工)或與液體靜壓力協同地作用(act)。例如，在萃取溶液中，鹽類的低滲壓濃度可引起細胞膨脹且可與加工(諸如，機械加工)或與壓力循環處理協同地作用以毀壞細胞質膜。相反地，高滲壓鹽濃度可用來在某種壓力循環[或加工(諸如，機械加工)]條件保護細胞免遭破壞，若此一結果為所欲的。例如，對哺乳動物的細胞，低於約0.9%的NaCl濃度為低滲壓且高於約0.9%為高滲壓。

清潔劑以及離液序列高的試劑

[0364]一清潔劑以及離液序列高的試劑(例如，離液序列高的鹽類)可被加到一溶劑相以幫助一有興趣的分子本體(例如，組分)之萃取。在某些具體實施例中，所使用之清潔劑以及離液序列高的試劑之量可小於用於已知分配技術[諸如，並不應用在此所描述的溶劑或係基於機械搖動(例如，在沒有在此所描述的溶劑的情況下)的技術]之量。在某些具體實施例中，當一清潔劑係於在此所描述的方法中被使用之時，在萃取的期間並無發泡被形成。

[0365]可被使用之清潔劑的實施例包括下列：陰離子清

潔劑(例如，SDS、膽酸鹽、去氧膽酸鹽)；陽離子清潔劑(例如，C16TAB)；兩性清潔劑(例如，溶鹽膽鹼、CHAPS、Zwittergent 3-14)；以及非離子清潔劑[例如，辛基葡萄糖苷、毛地黃皂苷、C12E8、Lubrol、三硝基甲苯X-100、Nonidet P-40、吐溫(Tween). 80]。一些兩親的有機溶劑[諸如，氟化醇(HFIP、TFE、全氟辛醇等等)]係常常被認為是具有清潔劑官能度。此等溶劑可作為一至其他溶劑以及緩衝液系統(例如，在此所描述的溶劑以及緩衝液系統)的添加劑而單獨或以組合方式被使用。

[0366]所使用的清潔劑之濃度可為，例如，自約0.001%至約10%，例如，約0.1%至約2%，例如，約0.5%至約4%，例如，約1%至約2%。

[0367]在某些具體實施例中，液相(例如，混合的液相)為無或實質上無清潔劑。

[0368]一離液序列高的試劑亦可被使用。此等試劑的實施例包括下列：脲、氯化胍、氯化異硫氰酸胍以及鹽酸胍。所使用的濃度可為約0.1M至約8M。離液序列高的試劑之實施例包括那些，例如，在美國專利第7,064,192號與美國公開申請案第2006-0188970；2004-0038333；2003-0083475；以及2002-0137157號中所描述的。

在液體中的其他組分

[0369]在此所描述的液相可任擇地含有另外的試劑。例如，一酶抑制劑，例如，一或多種蛋白酶抑制劑(例如，絲胺酸、半胱胺酸以及天冬胺酸蛋白酶以及胺肽酶的抑制劑)

[例如，4-(2-胺基乙基)苯磺醯氟(AEBSF)、抑胃酶肽A, E-64、苯丁抑制素、亮抑蛋白酶肽以及抑肽酶]；DNA酶抑制劑(例如，金精紅三羧酸)；RNA酶抑制劑[例如，焦碳酸二乙酯(DEPC)、三氟乙酸銨(CsTFA)、重組胎盤RNA酶抑制劑、SUPERASE•IN™、ANTI-Rnase 或 RNASECURE™ (Ambion)、SCRIPTGUARD™ (Epicentre Biotechnologies)、DEPC]；金屬螯合劑[例如，DTPA、EDTA、EGTA、NTA、得斯芬(desferal)]等等可被加到液相，例如，以穩定一有興趣的組分，例如，一正被萃取的組分。

[0370]作為另一實施例，礦油可被包括在液相中。礦油至試樣的添加可改善區帶敏銳度以及強度。例如，如在實施例中所描述的，增加在一試樣中的礦油量可為有利的，例如，在離心[分離]的期間，藉由改善相分離以可供在一試樣中內源性脂質的有效分配到油層裡。

鹽類

[0371]高濃度鹽可影響某些蛋白質的沈澱範圍。例如，高濃度鹽可妨礙或促進蛋白質沈澱。一般，內源性試樣衍生鹽類係不足以造成任何對沈澱的顯著影響。在許多情況下，外源性鹽類添加以改善總蛋白質沈澱。此外，最佳化的鹽濃度可用來選擇地沈澱所欲的蛋白質且將不欲的蛋白質保持在上清液中且反之亦然。例如，此一途徑可用來減少一高度地高豐度蛋白質物種的複合試樣(例如，血清清蛋白、免疫球蛋白等等)且為生物顯著性的低高豐度蛋白質而濃集。

[0372] 一高鹽濃度表示，基於溶液的總重量，一多過約1%以重量計的鹽濃度。例如，基於溶液的總重量，鹽濃度為至少約5%；或至少約10%以重量計。

[0373] 高鹽溶液的實施例包括下列：氯化鈉-飽和溶液(35.9g/100mL，在25°C)；在水中的硫酸銨-飽和溶液(70.6g/100mL，在0°C，或103.8g/100mL，在100°C)；4M 氯化異硫氰酸胍。

[0374] 一低鹽濃度表示，基於溶液的總重量，一小於約1%以重量計的鹽濃度。

第二容器

[0375] 於某些在此所描述的萃取方法之具體實施例中，一第二容器(例如，膠囊、安瓿)可以混合物形式存在，該混合物係被暴露於在此所描述的萃取方法[例如，包括壓力週期及/或加工(諸如，機械加工)的方法]。第二容器的內含物可包括一試劑或多重試劑，該一試劑或該等多重試劑將在足以使第二容器釋出其等內含物(例如，破裂)之一特定位準的壓力或加工(諸如，機械加工)的使用期間而被導入至主容器。在某些具體實施例中，第二容器可用凍結成份(例如，水)而被製作。例如，在此等具體實施例中，壓力或加工(諸如，機械加工)，例如，熔化第二容器且使其釋出其等內含物。或凍結第二容器可為惰性的且用來含有一活性成份或是凍結第二容器本身可為活性成份(例如，以及壓力可熔化為活性成份的容器且藉此使容器釋出其等內含物)。

[0376] 該(等)在壓力或加工(諸如，機械加工)的使用期

間被導入之試劑可或供作為一第二(或是第三等等)液相以促進試樣組分的分配。交替地，此試劑對現存的(諸)液相可供作為一添加劑。試劑可在萃取方法中被使用以，例如，增加一(諸)有興趣的組分的分配、增加一有興趣的組分的溶解度、增加一污染物的分配(例如，非有興趣的組分，例如，轉成不含有有興趣的組分之一相)、改變萃取溶劑的性質(諸如，pH值、滲透壓力等等)。此等試劑的實施例包括有機溶劑、兩親的溶劑；離液序列高的鹽類或清潔劑溶液、清潔劑溶液{十二烷基硫酸鈉、[(3-膽鹽胺丙基)二甲銨基]-1-丙磺酸鹽(CHAPS)、吐溫-80}、一有機溶劑[例如，己烷、戊烷、甲醇、乙醇、乙腈、甲基-叔-丁基醚(MTBE)、正丙醇、異丙醇、異戊烷、辛烷、癸烷、環己烷、二甲苯、苯、亞苺基等等或其等之混合物]、兩親的試劑(例如，HFIP、TFE)、鹽類(諸如，氯化鈉、乙酸鋰、碳酸氫銨、乙酸銨等等；酸或鹼(諸如，三氟乙酸、甲酸、乙酸、氫氧化銨、氫氧化鈉、氫氧化鋰等等)。

[0377]一或多種此等試劑可，例如，自相同或不同第二容器，例如，因壓力循環而被導入至一定壓力位準。例如，第二容器可被設計在一定壓力位準或以上以釋出其等內含物(例如，破裂、漏洩、溶解或熔化)。在某些具體實施例中，多過一個第二容器可被使用。例如，正當一第二容器可被設計在一壓力以釋出其等內含物的時候，一第二容器可被設計在一第二壓力以釋出其等內含物等等。這樣，不同的試劑(或相同試劑於一分開劑量方式)可在控制次數(例如，

在一定壓力週期的數目之後)被引入混合物。第二容器係不在其等之形狀或設計上受限制。如在此所使用的，名詞“第二容器”表示一形式(例如，密封形式)，其等內含物包括一試劑且防止試劑的引進入在第二容器中所含有混合物或液相中直到壓力或加工(諸如，機械加工)係被提升至使第二容器釋出其等內含物之一位準。材料係不被限制，其中第二容器係用該材料所製備。例如，第二容器可由凝膠狀的材料、纖維素聚合物、玻璃、聚合物(SAN、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯、其他聚合物等等)製成。第二容器將被毀壞之壓力或加工(諸如，機械加工)將藉由第二容器材料的剛性以及第二容器內之試樣與其他可壓縮材料(例如，氣體、空氣、氮氣、二氧化碳、氧氣、惰性氣體：氦氣、氬氣、氖氣等等)的量及/或藉由容器的組成物而被界定。例如，第二容器在其抗壓強度將低於第二容器內含物的壓縮度之壓力位準將釋出其等內含物(例如，破裂、漏洩或熔化)。第二容器亦可用非晶形或晶形化合物而被製造，該化合物的熔點係高於在大氣壓力之試樣加工溫度。高壓的使用將熔化第二容器材料。交替地，整個的第二容器可用待被加到液體試劑(例如，固態冰相、固脂、石蠟等等)的混合物之成份被製備。此材料將在壓力之下成為液體且可參與試樣組分的分配。其因混合物的降壓可或可不再固化。若此組分果然固化且若其將含有數種起始混合物的組成，組分可從混合物中藉由從混合物中固化材料的簡單移除而被分級分離。該等組成係在壓力之下被分配成該組分。

附加的步驟

[0378]在此所描述的萃取方法可單獨或配合一或多個附加的步驟/方法被進行以分離一有興趣的組分。該(等)附加的步驟可在一在此所描述的萃取方法之前或之後被進行。例如，離心[分離](例如，梯度離心[分離]或超離心[分離]) (例如，在相同器皿中之離心[分離]，其中在此所描述的一萃取方法係被進行)、沈澱(例如，一或多種試樣組分之沈澱)、免疫沈澱(例如，用以移除一污染物)、透化(例如，一細胞的，例如，使用一清潔劑)、使用低滲壓緩衝液條件以破壞質膜或其他環繞胞器的膜、用於一特定組織的增濃、細胞或微生物類型、膜部分等等；根據試樣組成在細胞或組織中的部位或根據試樣組成物理化學性質(例如，靜電電荷、疏水性、在一特定溶劑中的溶解度、分子構型或結合親和性等等)之試樣組成的分級分離可以一萃取方法而單獨被進行，該萃取方法係在此被提供以改善一有興趣的組分之隔離或純化。

用於萃取的組分源

[0379]在此所描述的方法可用來從一試樣中萃取一有興趣的組分，若該有興趣的組分具有一物理化學性質(例如，在一溶劑或溶劑系統中的靜電電荷或溶解度)，則該試樣含有至少兩組分。該物理化學性質不同於該(等)其他在試樣中之組分者。

[0380]一組分可從源中被萃取之源的實施例包括生物以及合成(例如，人造)源。生物起源之源的實施例包括哺乳

動物的(例如，人或家畜)、真菌、細菌、病毒的以及植物源。此等源的實施例包括一細胞、一胞器(例如，粒線體、核、高爾基體、葉綠體、內質網、液泡、頂體、中心粒、纖毛、乙醛酸循環小體、氫化酶體、溶酶體、黑素體、線體、肌原纖維、核仁、括弧體、過氧化物酶體、核糖體、微粒體、小泡)、一薄膜(例如，一脂膜，例如，一脂雙層)、一生物試樣[組織試樣(脂肪組織、肝臟、腎臟、皮膚、胰臟、胃、小腸、大腸、乳房、卵巢、子宮、前列腺、骨骼、腱、軟骨、頭髮、指甲、牙齒、心臟、腦、肺臟、皮膚、神經、活體檢視等等)、血液、尿液、奶、精液、唾液、黏液、其他體液以及固體]、細胞的聚集(例如，血液、精液、黏液、唾液、組織活體檢視)、一古代的試樣[例如，化石(例如，化石動物、化石木材、化石骨骼、化石牙齒、化石糞等等)]。其他源的試樣包括奶油、乳脂、一藥學或化妝品配方(軟膏、洗劑、乳劑、洗髮精、潤髮液、奈米粒子藥物配方等等)、一取片劑、膠囊或膠囊錠形式形狀之藥學配方、一多相組成物{諸如，乳膠或固體粒子的懸浮液[油墨、塗料(例如，乳膠漆)、噴漆、潤滑劑、燃料、化學合成的成份等等]、脂質體的懸浮液、膜囊、液體推進劑、燃料、彈性體、聚合物、油墨配方；水中以及其他溶劑中油乳膠(諸如，工業潤滑劑)、土壤(例如，土壤試樣的懸浮液)、礦物等等}。

經萃取的組分

[0381]可藉由在此所描述的方法而被萃取之組分(例如，分子本體)的實施例包括一蛋白質(例如，膜結合蛋白、

跨膜性蛋白、I型或II型膜蛋白、受體、酶、一脂蛋白、一糖蛋白)、一多醣(例如，肝素或肝素衍生多醣、澱粉、菊粉等等)、一蛋白聚糖(例如，膠原[蛋白]、幾丁質、胞壁質等等)、一多酚(例如，一單寧)、一苯基丙酸類 (例如，一木[質]素、一類黃酮)、一維生素、一毒素、一污染物[質]、一脂質{例如，磷脂[例如，卵磷脂(PtdCho)、磷脂醯乙醇胺(PtdEtn)、磷脂醯肌醇(PtdIns)、磷脂醯絲胺酸(PtdSer)]、糖脂、類固醇[例如，雌激素、孕酮、雄激素、睪酮、蛻皮類固醇(諸如，蛻皮固酮)、皮質類固醇激素(諸如，糖皮質[激素]以及鹽皮質[激素])、促蛋白質合成類固醇、膽固醇、植物固醇、油菜固醇、麥角固醇]}、一薄膜(細胞膜、胞器膜、脂雙層)、一核酸[DNA (核DNA、粒線體DNA)、RNA (信使RNA、轉移RNA、核糖體RNA、粒線體RNA、小分子RNA)]、一病毒(例如，HIV；HPV；A、B、C、D、E、F或G型肝炎；巨細胞病毒、愛波斯坦-巴爾病毒、黃熱病等等)、一細菌(例如，革蘭氏陽性或革蘭氏陰性菌、互利共生體細菌、病原細菌)、一存在於一細菌細胞或一其他微生物或其他細胞類型之細胞中的組分(例如，一藉由細菌、酵母菌或一哺乳動物的細胞重組所產生的蛋白質)、被夾在包含體、細菌DNA或RNA之中的重組蛋白質、一抗原(例如，來自一細菌、真菌或哺乳動物的細胞或來自一病毒者)、一病毒(例如，用於疫苗生產者)、一藥學試劑[諸如，一小分子、一代謝物(例如，一小分子代謝物)]、一殺蟲劑[例如，殺菌劑、殺真菌劑、除草劑、殺蟲藥(例如，殺卵劑、殺幼蟲劑或殺成蟲劑)、

殺蟎劑、軟體動物殺滅劑、殺線蟲劑、殺鼠劑、殺病毒劑]、一藥物(例如，一藥學藥物)、一藥物代謝物、一染料、一食品成分、一奈米粒子配方、一脂筏、一澱粉斑塊、微管、細胞溶質、油、萜以及其他親脂性化合物(例如，來自植物材料者)、來自植物(例如，藥用植物)的數種化合物(例如，生物鹼、類黃酮、異黃酮、原花色素、花色素苷)、食物調味劑成分(例如，辣椒素)(例如，來自食物製備者)、脂溶性維生素(例如，生育酚、類胡蘿蔔素、蕃茄紅素等等)(例如，來自植物油或動物脂肪者)、局部藥物配方組成(例如，來自皮膚以及深部組織者)、一特定細胞類型、聚合物、彈性體、潤滑劑、顏料、塑化劑等等。例如，自富脂質脂肪組織之膜蛋白的萃取或自肝微粒體部分之酶(諸如，細胞色素P450)的萃取係大大地被簡化且所欲蛋白質的較高產率係被獲得。

[0382]細胞類型的實施例包括胚葉細胞、蛋、胚胎幹細胞、上皮細胞、紅血球、成纖維細胞、肝細胞、白血球、肌肉母細胞、肌管、神經元、卵母細胞、造骨細胞、破骨細胞、精子、T細胞、[接]合子(動物或植物)、糊粉、厚角組織、內皮層、胚乳、表皮、葉肉、分生細胞、柵狀薄壁組織、韌皮部篩管、韌皮部生殖、韌皮部營養、厚壁組織、假導管、木質導管。亦被包含的為下列的數種類型：角化上皮細胞、潮濕的複層表皮細胞、外分泌分泌型上皮細胞、激素分泌細胞、腸道、外分泌腺與泌尿生殖道細胞、代謝與貯藏細胞、障壁功能細胞(肺、腸道、外分泌腺以及泌尿

生殖道)、襯於關閉的內部體腔的上皮細胞、具推進功能的纖毛細胞、細胞外間質分泌[作用]細胞、收縮細胞、血液與免疫系統細胞、感覺轉導細胞、自主神經元細胞、感覺器官與周邊神經元支持細胞、中樞神經系統神經元與膠質細胞、晶體細胞、色素細胞、生殖細胞、滋養細胞。

經萃取的組分之分析

[0383]經萃取的組分可藉由數種習知的方法而被分析。例如，使用在此所描述的方法而被純化之一有興趣的組分(例如，含有一有興趣的組分之一相)可與下游程序(例如，分析方法)相容(例如，與不適合於清潔劑的程序相容)及/或可直接地被使用於此等程序中。

[0384]例如，雙向凝膠電泳；單向凝膠電泳、蛋白質印跡、酶聯免疫吸附測定、蛋白質或肽質量指紋圖譜(例如，使用MALDI-TOF/TOF)、多維電泳(例如，溶液相等電聚焦再加上濃縮pI部分的雙向凝膠電泳)、質譜法(MALDI-MS、LC-MS/MS、MALDI-TOF MS或LC-ESI-MS/MS)、PCR、RT-PCR與微陣列、薄層層析、液相層析(例如，HPLC)、氣相層析、GC/MS、電子顯微術、螢光顯微術以及表面分析方法。在某些具體實施例中，經分離的分子或其等之複合物可在功能性測定中被使用，例如，酶活性測定、體外代謝測定等等，或被受到隨後的分級分離或萃取步驟。

[0385]含有自萃取方法所獲得之(一)有興趣的組分之(諸)相可不需要進一步純化且可直接地適合於某些分析的方法，例如，HPLC及/或LC/MS、GC及/或GC/MS (例如，

由於沒有清潔劑、溶劑的揮發性以及不具先前溶劑移除而將產生的萃取物直接地注射到HPLC管柱塔上的能力。試樣的直接應用可將有興趣的組分由於降解或試樣操作之可能的損失減至最低程度。

元件

[0386]在此所描述的萃取方法可在一些元件中而被進行，但是並不被限制於一特定元件的使用。例如，一可供試樣(混合物)液液分配之用或促進其者之元件可被應用。第2圖提供使用溶劑用於試樣組分之溶解以及分配之一次性使用試樣容器的一實施例。兩個部分係藉由一多孔圓盤(分解圓盤)而被分離。此圓盤可被定位於接近液相邊界的預期位置。當溶劑邊界遇到圓盤之時，該圓盤形成紊流，導致經改良之具試樣材料的溶劑以及多溶劑彼此之混合。此促進在壓力循環的期間兩種液體之混合。由於在循環期間的加壓法，質量傳送使液體界面橫穿過圓盤。液體靜壓力改變溶劑相互的互溶度。當溶劑係在交替液體靜壓力(例如，壓力循環)之下被混合之時，較好的試樣粒狀物材料之溶解可被達到。如在第3圖中所說明的，藉由壓力循環而被作為引起媒介的液液分配可發生如下：

- 1.非互溶的溶劑a與b係被放置於具固體試樣的試樣容器中，該固體試樣含有多數組分。

- 2.液體靜壓力 P_2 引起液體與固體試樣的壓縮。當溶劑邊界遇到多孔圓盤之時，溶劑的快速混合發生。

- 3.在液體靜壓力之下的培養改變溶劑的互溶度，導致

一第三介穩定溶劑c的形成，該第三介穩定溶劑c具有溶劑a與b的混合性質。試樣溶解可在此階段發生。

4.至一較低壓力P3之系統降壓引起混合物的擴張以及溶劑a與b的分離且介於溶劑a與b之間溶質的分配，該分配係根據其等的分配係數logP或分佈係數logD(對部分地解離的溶質)。

5.系統返回到其在壓力P1之最初的平衡。在此階段，週期可被重複以繼續溶解以及分配程序。

[0387]在此實施例中，多孔圓盤(分解圓盤)係在一定位置中。對當前的元件，可被作出以使元件更適合於實施在此所描述之方法之改良包括：多孔圓盤之一可變位置；多圓盤的使用；待被插入一試樣管(例如，到頂或底部分裡)中的一第二容器，該容器含有一試劑(例如，如在此所被描述的)以在當壓力到達該第二容器釋出其內含物(例如，破裂)之位準的壓力之下被加入。

實施例

實施例1：從植物組織中脂質、蛋白質以及小分子的萃取

[0388]分子本體係從植物組織中被萃取。植物組織係被放置於一含有兩溶劑的溶劑系統中。溶劑A為50%含水乙腈以及0.1% 甲酸；溶劑B為氯仿。兩溶劑係呈兩分開的相而存在。混合物係被密封於一可撓式容器中。混合物係用20個週期在各別壓力循環10秒鐘處理。壓力從大氣壓力(101.3 Kpa在海平面)至240 MPa循環。在循環完成的狀態下，溶劑係被分配到兩分開的相裡且來自植物組織的分子本體係被

分配在兩溶劑之間。大部分親水組成保留在頂溶劑部分中，該部分由主要地水、甲酸以及小於50% w/w的乙腈組成。底部分含有疏水分子本體，該部分由主要地氯仿以及剩下的乙腈組成。二者部分可受到適用於個別的化合物之偵測以及定量的分析方法。

實施例2：從脂肪組織中脂質以及蛋白質的萃取

[0389]從脂肪組織中脂質以及蛋白質的萃取係使用一在純1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)中的100 mg組織試樣而被實施。HFIP為一兩親的溶劑，該溶劑與水以及與存在於試樣中的脂質形成穩定均勻的混合物。在藉由壓力循環的試樣萃取之後，因返回大氣壓力，產生的溶液變得非互溶的且分離成個別的相。正當高壓維持產生的相之部分的互溶性以增進在試樣組分之間的分配的時候，一壓力的減少作為以加速相分離之一重要的因素。接著，液體部分係被移除(例如，以吸量管)，然後，HFIP/水部分係直接地藉由HPLC所分析或被蒸發以濃縮蛋白質與核酸。交替地，蛋白質係藉由以過量水、一含水緩衝液或一鹽及/或其他試劑的水溶液之稀釋而從有機溶劑當中被沈澱出來。蛋白質部分係於一用於HPLC的慣用試劑中或在緩衝液(以清潔劑為基，例如，9M脲/4%CHAPS；或例如，2% SDS)中被重建以提供與精選的凝膠分離方法(例如，單-或雙-向凝膠電泳)之相容性。

實施例3：用於從脂肪組織中蛋白質萃取之技術的比較

[0390]在第2圖中所顯示的元件用於從脂肪組織中藉由

壓力循環之蛋白質的萃取。下列三種萃取試劑係被比較：

- 1.三羥甲基胺基甲烷(Tris)緩衝鹽水(TBS)，無清潔劑
- 2.9M脲+ 4% CHAPS
- 3.HFIP，一兩親的氟化醇

在TBS中所處理的試樣顯示脂肪組織最小限度的破壞以及極微的蛋白質萃取殘留物。

[0391]因爲高(在70%以內，以重量計)脂質含量使清潔劑隔絕成微胞，在脲/CHAPS中所加工的試樣並非完全地被溶解且含有疏水性蛋白，該疏水性蛋白仍然和脂肪含量相聯繫。在HFIP中所萃取的試樣並不含有可見殘留的油脂組織(其表現爲一白色油脂殘留物)。代之以，在條件3中，油脂以及溶劑分離成親水(底)以及疏水(頂)相。在壓力循環促進萃取程序的同時，兩親的溶劑同樣能夠溶解極性以及非極性組分。在降壓時，產生的萃取物分離成兩或多個相。

實施例4：從豬的脂肪組織中脂質、蛋白質以及小分子的萃取

[0392]使用一些溶劑之以壓力循環作爲引起媒介萃取的一比較係被進行。所比較的溶劑爲：HFIP + 0.1% TFA、三羥甲基胺基甲烷(Tris)緩衝液+0.9% NaCl以及2%含水SDS。在1.4 ml各個溶劑中之100 mg組織係被使用。各個試樣受到相同的壓力循環條件：30個週期，在各個週期的期間，240MPa歷經20秒鐘以及大氣壓力歷經20秒鐘。在以三種溶劑的一第一萃取之後，產生的親水相係藉由SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)以及考馬斯藍染色(Coomassie blue staining)而被分析。各個試樣係雙份而被試驗。與2%

含水SDS相比，大約兩倍之多蛋白質係藉由HFIP + 0.1% TFA溶劑而被萃取(數據未被顯示)。三羥甲基胺基甲烷(Tris)緩衝液+0.9% NaCl萃取最小量的蛋白質。

[0393]一第二萃取係在殘留的脂質殘渣上以相同相應的溶劑而被進行。產生的取物係藉由SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳以及考馬斯藍染色而被分析。最少量殘留的蛋白質係從以HFIP + 0.1% TFA溶劑所萃取的試樣被回收，證實，與其他經測試的溶劑比，一較大量蛋白質係在第一萃取中在此條件之下被萃取(數據未被顯示)。

實施例5：從脂肪組織中蛋白質的萃取：一HFIP對清潔劑的比較

[0394]實施例係被進行以比較HFIP以及一9M脲/4% CHAPS試劑以從鼠科的脂肪組織中以下列壓力循環萃取蛋白質的有效度：30個週期，在各個週期的期間，240MPa歷經20秒鐘以及大氣壓力歷經20秒鐘。與9M脲/CHAPS試劑比，兩至三倍之多蛋白質係以HFIP而被萃取。結果係被顯示於表1中。

			AVG mg/mL	STDEV
HFIP		第1組	4.48	0.36
		第2組	5.87	0.54
9M脲4% CHAPS		第1組	2.22	0.23
		第2組	2.37	0.16

實施例6：大鼠腦蛋白質萃取-二元以及三元溶劑組合

[0395] 實施例係被進行以從大鼠腦中萃取蛋白質。腦組織並不含有足夠的內源性脂質以引起相分離。第二疏水溶劑係被添加以“補償”內源性脂質的缺乏且加速相分離。

[0396] 所有試樣係以壓力循環而被加工-30個20秒鐘上、20秒鐘下的週期，35,000 psi作為高壓以及大氣壓力作為低壓。按實驗條件，50 mg的組織係被使用。5 μ l蛋白酶抑制劑係被包括。試劑係被加到一1.4 ml的最終體積。

[0397] 經試驗的條件為：HFIP；己烷；礦油；HFIP/己烷1：2；以及HFIP/己烷1：1。

[0398] 在單獨以HFIP被萃取的試樣中，無相分離係被測得。當HFIP：己烷、HFIP/礦油以及HFIP/己烷/礦油係被使用之時，相分離係被測得。

[0399] 一更揮發試劑(己烷)的添加顯著地藉由蒸發加速溶劑移除。

[0400] 這些實驗提供一具清潔劑之萃取對具溶劑之萃取的比較。SDS未能抽出所有蛋白質的一理由或許主要地為化學計量的-沒有足夠的SDS以溶解所有的脂肪-所以冗長的機械均質化，一般，係被進行以回收所有被埋藏在脂肪微滴內的蛋白質分子。此程序通常形成許多泡體、泡沫以及乳膠，在那裡，蛋白質損失為不可避免的。依靠清潔劑以溶解脂肪的試劑將留下大多數脂肪完整的。相反地，壓力循環配合一溶劑(諸如，HFIP)，導致脂肪組織的完全溶解而無泡體或泡沫的形成。

實施例7：使用藉由壓力循環以及高解析串聯質譜儀的無清潔劑蛋白質萃取之脂肪組織的蛋白體分析

[0401] 脂肪組織的蛋白體分析對型2糖尿病、肥胖、癌症以及許多其他人體失調的研究有高度地價值。然而，被應用到具高脂質含量組織之慣用蛋白質溶解化作用方法傾向於產生高度地變化的結果，特別是對來自粒線體、內質網、質膜以及脂肪小滴之重要的疏水性蛋白質。大量的試樣衍生脂質傾向於將清潔劑隔絕成微胞，因此與蛋白質萃取相干擾。

[0402] 這些實驗對交替的液體靜壓力(壓力循環技術或PCT)以及種類繁多的有機溶劑的用途進行細胞、微胞以及膜斷片之無清潔劑破壞的研究且，與慣用均質化以及溶解技術相比，增加自小鼠脂肪組織試樣之蛋白質回收的效率。產生的蛋白質萃取物係藉由SDS-PAGE、2D-電泳、奈米等級流速的HPLC以及高解析力高質量準確度串聯質譜儀而被分析。

[0403] 一新穎的壓力循環輔助液液萃取以及分級分離方法已經被發展以達到將近完全組織溶解以及脂質和蛋白質的分級分離到性質不同的液相裡。除藉由新穎的壓力循環方法之整體較高的蛋白質回收以外，一些新穎的蛋白質種類係在脂肪組織的壓力循環萃取物中被辨識。亦已被證實，許多蛋白質在使用慣用方法所獲得的萃取物中為未被充分代表的。一些遺傳學上截然不同模式小鼠系已經在蛋白質表現中展現一些趨向，其可被連接到疾病惡化或供作

為可能的藥物標的。由分級分離產生的脂質部分已經被獲得且被收集用於未來脂質分型(lipid profiling)研究。

藉由壓力循環技術(PCT)的試樣製備

[0404] 這個研究的目的為從脂肪組織研究出一可靠且可重複的蛋白質萃取方法以使鼠科疾病模式的未來蛋白體試驗成為可能。來自野生型(WT)以及肥胖的(ObOb +/+)動物之白色脂肪組織試樣(腹脂墊)係被使用。來自一些個別的動物之大約相等的等分部分(100 ± 15 mg)之脂肪組織係經特別處理過的。同時的試樣均質化以及分級分離係在專用個別的一次性使用1.4ml容器(第2圖)中被進行，該容器使用在BAROCYCLER[®]NEP-3229(麻薩諸塞州西水橋的Pressure BioSciences, Inc.)中所產生之交替的液體靜壓力在室溫歷經20個週期。各個週期由在35,000 psi 20秒鐘再加上在大氣壓力20秒鐘組成。在所有的情況下，一蛋白酶抑制劑混合物(cocktail) (密蘇里州聖路易的西格瑪奧瑞奇)係被加到萃取試劑。在壓力循環處理之後，試樣管係從BAROCYCLER[®]被移開且被短暫地離心以加速液相的完全分離。除非另有說明，從各個管的頂液體層係以一載入膠片吸管尖頭而被移除且係被儲存用於脂質部分的隨後的分析。各個極性部分係在一SpeedVac離心濃縮器(賽默飛世爾科技)中被去溶劑化至大約5-10 μ l且在或2x Laemmli SDS-PAGE緩衝液(4% SDS)或是2D試樣緩衝液(9M脲，4% CHAPS)中被重建以提供與所欲下游分析方法的相容性。

[0405] 脂肪組織：脂質/蛋白質分級分離方法。交替的

液體靜壓力用來同時地均質化試樣且加速在一次可拋棄式容器中之在非互溶的液相之間試樣化合物的分配。萃取係在具0.2 mL礦油的1.2 mL HFIP中被進行。產生的萃取物係直接地適合於LC-MS/MS應用以及蛋白質的電泳分離。

[0406]直接地在2D試樣緩衝液中的控制萃取係在兩個連續步驟中被實施，各個萃取的50 µl等分部分係被移除用於蛋白質測定以及SDS-PAGE分析，然後，來自第一以及第二次的萃取物係被組合、被還原、使用TBP/丙烯醯胺經烷基化且被濃縮至在Amicon ULTRA-4超濾裝置（麻薩諸塞州丹弗斯的密理博有限公司）中的最初試樣體積。

電泳、影像分析以及膠體內消化

[0407]SDS PAGE係在4-12%聚丙烯醯胺梯度凝膠上被進行。固定pH值梯度長條pH值3-10係與試樣成水合物歷經6小時，再加上在10,000V的等電聚焦(IEF)歷經100,000瓦特-小時。所有預製電泳供應以及標準垂直凝膠電泳系統係來自加州海克力斯的Bio-Rad Laboratories，而IsoelectrIQ²綜合的IEF儀器係來自麻薩諸塞州溫本的蛋白體系統。凝膠係以膠態考馬斯亮藍(蛋白體系統)或SYPRO[®] Ruby (Bio-Rad Laboratories)而被染色、被掃描以及以PDQuest軟體而被分析以確定統計學上有顯著差異地經萃取的蛋白質。經選擇的凝膠點或區帶係被切除且使用慣用膠體內消化程序(protocol)而被處理。經改質之豬的胰蛋白腴(Promega)的序列測定梯度已經用於消化。

藉由奈米-LC FTICR串聯質譜儀的蛋白質識別

[0408]蛋白質消化液(5-10 μ L)係被加到一C₁₈固相萃取捕集塔(300 mm內徑x 5 mm,加州載安)以及75 mm內徑x 15 cm 奈米-LC反相自行填充熔融二氧化矽塔上 [靜止相: Magic C18AQ, 3 μ m, 100Å(麻薩諸塞州的Michrom Bioresources); 塔: PicoFrit, 經由10-門Valco閥被拉出的內徑15 mm尖端。肽分離係使用在0.1% FA中的乙腈之線性梯度而被進行且洗析液係藉由奈米電噴霧而被引入LTQ FTICR質譜儀(賽默飛世爾科技)。數據分析已經使用SEQUEST演算[法]以及GPMDB軟體在SORCERER™(Sage-N)搜尋引擎上被實施。該搜尋係對照著一組合的“前進”以及“倒退”FASTA DB而被進行。介於蛋白質識別數據的可靠性與敏感性之間的均衡係藉由把所估算的偽陽性蛋白質辨識比例(FPPrR)調整到 $\leq 1\%$ 而被設定。重複肽配對係根據Xcorr而被清除以消除由同種蛋白質以及同種型所引起的多餘。類似蛋白質係以不將多餘的東西加進DTASelect以及Protein Prophet輸出的蛋白質鑑定名單裡之最高分數的蛋白質記入而被列入。

結果以及討論

[0409]用以將脂質自應用有機溶劑以及兩親的氟化醇之膜製備中移除的實驗已經藉由慣用方法與細胞破壞以及分級分離相連而被進行。我們已經研究出一無清潔劑組織溶解以及分級分離技術,基於藉由交替的液體靜壓力所增進的液液萃取,該液體靜壓力藉由在介於非互溶的液體的界面暫時地形成一介穩定“混成”溶劑而加速被分析物之分

配。壓力循環儀器配置產生暫時地改變非互溶溶劑的相互溶解度之液體靜壓力的週期，造成在液相之間試樣組成之一效率更高的分配。在慣例的萃取中，高(例如，在70%以內，以重量計)脂質含量隔絕成微胞，留下和脂肪含量相聯繫的疏水性蛋白質。

[0410]從脂肪組織中之蛋白質的無清潔劑萃取係被進行。在降壓的時候，適當地所選擇的液相分開，根據其等在對應的溶劑中之分配係數，而帶有相應的被分析物。

[0411]不同萃取試劑的一比較係被進行。蛋白質回收係藉由由布拉德福德測定(Bradford assay)所測定者而被定量。各個萃取物的最終體積為1.4 ml。

[0412]一些有機溶劑(非極性的以及兩親的二者)之組合已經被發現與含水緩衝液一道以加速液液分配。該新的方法呈現與下游分離方法(諸如，電泳、層析法以及質譜法)的直接相容性。在蛋白質萃取效率中之一顯著的差異已經以數種溶劑系統而被證明。來自具IEF試樣緩衝液(9M脲，4% CHAPS)的脂肪組織試樣之二連續的蛋白質萃取係被進行且提供在第一萃取之後在大部分脂肪中留下之蛋白質的證明。

[0413]使用壓力循環之同時的脂肪組織破壞、藉由己醇的去脂作用以及在2x Laemmli試樣緩衝液(4% SDS)或去離子水中的萃取係被進行。正當溶劑(諸如，己醇以及苶醇)允許同時具以含水緩衝液萃取之組織的去脂作用的時候，一些極性溶劑(諸如，異丙醇)藉由其等在一逐步萃取途徑中疏水性之允許蛋白質的分級分離。

[0414]至某些溶劑組成物之兩親的溶劑(例如，HFIP)之添加導致一將近完全的組織溶解以及相分離。從一塊 100 mg正常鼠科的白色脂肪組織中之蛋白質的萃取係被進行。慣用2D試樣萃取緩衝液與一組織溶解的比較係被進行，在一含有六氟異丙醇溶劑系統中藉由壓力循環處理之該組織溶解具隨後的脂質部分與溶劑之移除以及在2D電泳試樣緩衝液中之重建。以CHAPS為基的2D電泳緩衝液主要地萃取血漿蛋白質，而以溶劑為基的萃取物含有脂肪組織之一將近完全的蛋白質補體。實施例係被提供於表2中。

表2：在藉由慣用方法所萃取的試樣中常常未被充分代表之脂肪的-特異蛋白質脂滴相關蛋白(perilipin)之實施例

蛋白質鑑定	電荷_肽列序	nsp adj prob
脂滴包被蛋白,脂滴相關蛋白[小家鼠]	3_ILHLTPAQAVSSTK	1
gi 26279005 gb AAN77870.1	2_EVTALPNPR	1
gi 26327331 dbj BAC27409.1	3_IASELKGTISTR	0.85
gi 28316726 ref NP_783571.1	2_LASGGADLALGSIEK	1
gi 42559472 sp Q8CGN5 PLIN_小鼠	2_ILHLTPAQAVSSTK	1
機率評分：1.00	2_VSTLANTLSR	0.95
序列涵蓋範圍：28.11%	2_ETAEYAANTR	0.83
獨特胜肽配對的數目：7		

[0415]一些蛋白質已經被發現在使用慣用萃取技術所獲得的脂肪組織之蛋白體圖譜中為大規模地未被充分代表的。這些蛋白質以及其等之轉譯後修飾之詳細的分析可在脂肪酸代謝作用的調節上提供決定性的訊息以及可能的方式以避免型II糖尿病與肥胖的發生。例如，鼠科FABP aP2

的一些同種型之一者的代表性光譜說明係被進行。aP2基因產物的多樣性可藉由轉譯後修飾而被解釋，該等轉譯後修飾可能(地)具有一調節角色。

實施例8：自HFIP的蛋白質回收；藉由蒸發對用蒸餾水沈澱之溶劑移除

[0416]極性與非極性試樣組成之壓力輔助萃取以及分配引起至少一液相的形成，該液相為試樣的一溶液。在某些情況下，許多的液相係被形成。相可藉由適合的技術而被物理性分離。產生之個別的相係藉由若干可能的方法而受到分析：包括HPLC的管柱層析法；凝膠電泳，例如，SDS-PAGE或2D-凝膠電泳等等。

[0417]在此實施例中，有興趣的試樣組成爲蛋白質。再者，該等蛋白質被溶解於一有機溶劑中。在某些情況下，溶劑爲一含鹵素的有機溶劑(諸如，氯化醇、氯化酸、氟化醇、氟化酸等等或一該等之混合物)。一些含鹵素的有機溶劑可起清潔劑作用，在他們引起對蛋白質構型變化的意義上。在一些實施例中，在一有機溶劑中的蛋白質構型可不同於在一水溶液中的蛋白質構型。在有機溶劑中的蛋白質溶解度可藉由一試劑(諸如，一水溶液)的添加而被改質。正如此實施例顯示，蛋白質或其他溶質在有機溶劑中的濃度可能必須爲在一定低限之上以誘發效率高的沈澱。

[0418] **實施例8a.**在1 ml HFIP中之250 mg牛的脂肪組織係藉由壓力循環而被加工。壓力循環條件如下：20個在35 kpsi 20秒鐘再加上在大氣壓力20秒鐘的週期。脈衝(PULSE)

管係在壓力循環步驟中被使用。

[0419]在壓力循環之後，試樣係在11,000g 而被離心以便加速相分離成一脂質部分以及一蛋白質部分。下(lower)部分(含有蛋白質)係被回收且被分裂成相等大小的等分部分。等分部分之一者係在離心真空濃縮器中(SpeedVac，麻州華森的賽默飛科技)被蒸發至乾燥。雙份等分部分係藉由蒸餾水的添加(試樣體積的3倍)所沈澱、在冰上被驟冷歷經10分鐘以及沈澱物(pellet)係藉由在11,000g歷經15分鐘的離心[分離]而被回收。上清液(水/HFIP混合物)係被轉移到一乾淨的管且如以上所描述的被蒸發以確定是否任何蛋白質係在沈澱的期間被損失。

[0420]所有試樣係在SDS-PAGE試樣緩衝液中被重建且在一凝膠上跑。產生的凝膠係以考馬斯藍被染色以藉由兩種方法比較蛋白質回收(數據未被顯示)。凝膠結果顯示在這些條件之下，蛋白質區帶型式以及強度在相對於經蒸發的試樣之經沈澱的試樣中為類似的。此外，凝膠分析證實，在沈澱之後，無可探測出的蛋白質存在於水/HFIP上清液中，此證實在試樣沈澱的期間沒有可探測出的蛋白質損失。

[0421] **實施例 8b.** 當牛的脂肪組織係如上而被加工之時，但是組織質量對HFIP體積的比率係被從250 mg/ml減少到大約40 mg/ml (相對應於藉由壓力循環所加工之在1.3 ml HFIP中的50 mg牛脂肪組織)，沈澱反應並不有效地回收經溶解的蛋白質且大部分試樣係被測得遺留在水/HFIP部分中。

[0422] **實施例8c.**當牛的脂肪組織係如上而被加工之時，但是組織質量對HFIP體積的比率係藉由減少HFIP的體積而被從大約40 mg/ml增加到125或167mg/ml(這些比率相對應於在0.3-0.4 ml HFIP中的50 mg組織)，沈澱反應效率係被恢復。試樣係在經沈澱的沈澱物(pellet)中被回收且無可探測出的蛋白質被損失於水/HFIP部分中。爲了置換在脈衝(PULSE)管中額外的體積，礦油係被加到反應以致最終總反應體積在1.3-1.4 ml以內。額外的礦油對壓力循環萃取或沈澱反應沒有明顯的正面或負面的影響。

[0423] **實施例8d.**類似的實驗係以肉牛脂肪組織而被進行以試驗不同的脂肪組織：HFIP比率(質量：體積)。該比率係藉由變化礦油的體積而被調整。結果顯示沈澱效能在較高的脂肪組織：HFIP 比率，例如，~ 160 mg/ml，係被改善。

實施例9：在藉由壓力循環之蛋白質萃取上之礦油的效應

[0424] **實施例9a.**至壓力循環作用之礦油的添加可藉由改進相分離而爲有利的，不管試樣係從溶劑中是藉由乾燥還是藉由沈澱而被萃取。此外，脂質相的移除可不被要求在藉由沈澱方法之蛋白質回收以前，若脂質部分的回收爲非預計的(參照，例如，實施例10)。

[0425] 50mg豬的脂肪組織係藉由壓力循環在3種不同的HFIP/礦油組合中而被加工(0 ml油/1.3 ml HFIP；0.1 ml油/1.2 ml HFIP或0.5 ml油/0.8 ml HFIP)。在壓力循環之後(20個在35 kpsi 20秒鐘再加上在大氣壓力20秒鐘的週期)，

試樣係在11,000g 而被離心以便加速相分離成一脂質部分以及一蛋白質部分。來自各個試樣之下部分(含有蛋白質)係被轉移到一清潔的試管且在離心真空濃縮器中(SpeedVac, 麻州華森的賽默飛科技)被蒸發至乾燥。所有試樣係在SDS-PAGE試樣緩衝液中被重建且在一凝膠上跑。產生的凝膠係以考馬斯藍被染色以比較蛋白質回收與區帶敏銳度(數據未被顯示)。凝膠結果指出在這些條件之下, 至試樣之礦油的添加促進在區帶敏銳度以及強度中的某些改善。將礦油的量從每試樣0.1增加至0.5 ml沒有有害的效應且可實際上已經為有利的, 正如在含有0.5 ml礦油的試樣中的區帶為三種經測試的試樣中最強的。總之, 油的添加不是不利的且對相分離以及萃取效率可為有利的。

[0426] **實施例9b.**至壓力循環作用之礦油的添加可藉由加速在試樣中的相分離而為有利的, 該等試樣(諸如, 腦組織)通常並不分離成相。120-130 mg大鼠腦組織係在3種不同的HFIP/礦油組合中被萃取(0 ml油/1.1 ml HFIP; 0.1 ml油/1.0 ml HFIP或0.5 ml油/0.6 ml HFIP)且藉由藉由於20個在35 kpsi 20秒鐘以及在大氣壓力20秒鐘的週期之壓力循環而被加工。雙份試樣係藉由乾燥以及藉由沈澱而被加工。凝膠結果指出礦油的添加以及隨後的試樣之乾燥明顯地改善區帶敏銳度。不具礦油的添加, 存在於試樣中的內源性脂肪係不被有效地移除且引起微胞的形成, 該等微胞明顯地與在SDS-PAGE凝膠上的區帶分離相干擾。當礦油係被加到反應時(或0.1或是0.5 ml), 經改善的相分離便於在離心[分

離]的期間內源性脂質效率高的分配成油層。結果，凝膠電泳結果係顯著地被改善。至試樣之礦油的添加亦引起一些改良，該等試樣接著係被沈澱，儘管即使在沒有所添加的油的情況下，經沈澱之試樣比乾燥的試樣呈現更好的區帶分離。

實施例10：其他的溶劑移除的方法：結果比得上那些使用礦油所獲得者

[0427]在某些情況下，礦油之添加的相同利益可藉由從乾燥程序(protocol)換到沈澱程序(protocol)而被達到。120-130 mg大鼠腦組織係在2種不同的HFIP/礦油組合中被萃取(0 ml油/1.1 ml HFIP、0.1 ml 油/1.0 ml HFIP)且藉由於20個在35 kpsi 20秒鐘以及在大氣壓力20秒鐘的週期之壓力循環而被加工。在壓力循環之後，試樣係在11,000g而被離心以便改善相分離且下部分(含有蛋白質)係被回收以及係藉由蒸餾水的添加(試樣體積的3倍)所沈澱、在冰上被驟冷歷經10分鐘以及沈澱物(pellet)係藉由在11,000g歷經15分鐘的離心[分離]而被回收。試樣係在SDS-PAGE試樣緩衝液中被重建且在一凝膠上跑。產生的凝膠係以考馬斯藍被染色以比較蛋白質回收與區帶敏銳度。凝膠結果指出在這些條件之下，所添加的油沒有顯著的缺點。很可能在這些沈澱條件之下，內源性脂質並不與蛋白質沈澱且因此在電泳的期間並不存在於試樣中。

實施例11：外源性鹽類的效應

[0428]外源性鹽類可被添加以改善總蛋白質沈澱。此

外，優選鹽濃度可用來選擇性地沈澱所欲的蛋白質且將不欲的蛋白質保持在上清液中。四種經純化的蛋白質-牛的血清清蛋白(第五組分) (BSA)、碳酸酐酶、雞蛋清溶菌酶以及人體 γ 球蛋白(所有自密蘇里州聖路易的西格瑪奧瑞奇而被獲得)-係被溶解於HFIP中至20 mg/ml的最終濃度。個別的蛋白質或所有四種蛋白質之一1：1：1：1混合物係以一三倍過量體積的dH₂O而被沈澱、被沈澱在冰上歷經20分鐘以及在10,000g被離心歷經15分鐘。沈澱物(pellet)係在SDS-PAGE試樣緩衝液中被重建。上清液亦被回收、在一SpeedVac中被完全乾燥以及被再懸浮於SDS-PAGE試樣緩衝液中。所有產生的試樣係在一凝膠上跑。產生的凝膠係以膠態考馬斯藍被染色。

[0429]以蒸餾水之蛋白質沈澱的效率為蛋白質特異。正當BSA以及碳酸酐酶有效地沈澱且係以一沈澱物(pellet)而被恢復的時候，溶菌酶以及 γ 球蛋白二者主要是保留在上清液中。

[0430]再者，相同蛋白質的混合物藉由用dH₂O之某些蛋白質的選擇性沈澱而被分級，而其他保留在溶液中。然而，25mg/ml NaCl溶液而不是dH₂O的添加改善並不單獨以水沈澱之蛋白質的沈澱。此方法可被應用於分級複雜蛋白質混合物。

實施例12：一用於和來自生物試樣之蛋白質、核酸以及脂質的分配同時進行的分離之無清潔劑試樣製備技術

[0431]此方法利用一藉由交替的液體靜壓力(壓力循環

技術或PCT)之細胞破壞的協同組合以及一試劑系統，該試劑系統將性質不同的分子種類溶解且分配成分開的部分。PCT輔助液液萃取使用高液體靜壓力以改變溶劑合[作用]能以及數種化合物的溶解度。在大氣壓力為非互溶的一些液體在高壓之下以此一方式相互作用以致相邊界呈現缺一用於在溶劑相之間分子分配的障壁。結果，分配存在於器皿之整個的體積中，而非正好在界面。蛋白質以及脂質在壓力之下為溶解了的且係藉由親水親油的有機溶劑[諸如，氟化醇，例如，六氟異丙醇(HFIP)]而被維持在溶液中。新的PCT/HFIP萃取方法提供效率高的來自試樣之蛋白質、脂質以及核酸的同時萃取，該等試樣為珍貴的或獨特的(諸如，人類或野生動物活體檢視組織)或為難以複製(諸如，像初期幹細胞培養的小細胞族群)。本方法的另一優勢為在非均一的試樣中之更精確的分析。因為將試樣分割用於分離蛋白質、脂質以及核酸分析為非必須的，由於在試樣中組分不均勻的分佈之人為構造係被避免。藉由PCT以及在HFIP中萃取的試樣之組合取決於非酶以及無清潔劑溶解且試樣組分分配成有效地以及容易地從許多不具對多重複製、不便利以及費時間的組織均質化方法或大範圍的萃取後清理的需要之類型試樣中萃取脂質、蛋白質、RNA以及DNA。因此，新穎的方法可有助於使獨特的系統生物學研究成為可能，在那裡，具蛋白質表達的轉錄圖像之關聯、轉譯後蛋白質修飾的分析以及組織脂質組成物係，由於可獲得的材料之有限量，預先而被認為不實用的，或在那裡，

在個別的試樣之間的變化性為太大以致於無法允許在複製之間精確的比較。

[0432] 新方法不僅對小以及珍貴的試樣而且對一用於多重組分的純化之單一簡便方法為所欲之處之較大的試樣為有利的。因為PCT/HFIP紀錄對大試樣為容易地可稱的，其與其他目前可獲得的方法相比有許多優點。HFIP可以高達250-300 mg/m的試樣對溶劑比率而被使用且在某些情況下可能更高。當隨後的純化步驟涉及沈澱反應之時，較高的試樣對溶劑比率為重要的，因為在更稀釋溶液中這些總是效率較不高的。在大部分的試樣之蛋白質以及脂質之PCT/HFIP萃取之後，富於核酸的部分可於一用於隨後的RNA或DNA純化之相對地小體積試劑中而被提。此將可供效率高得多的從大試樣中的萃取之用，該等大樣含有小RNA以及DNA(例如，土壤、優酪乳、皮膚等等)。

[0433] 藉由液體靜壓力在一親水親油的溶劑(諸如，HFIP)中的萃取，引起快速細胞破壞、脂質的溶解以及蛋白質的溶解與變性。在降壓之後，核酸並不保留在溶液中且可在試樣萃取之後從不溶解部分被回收。此外，由於有利於更多親脂性蛋白質萃取之獨特的條件，獨特地藉由新方法所萃取的一些蛋白質種類已經藉由膠體內胰蛋白酶的消化以及LC-MS/MS而被辨識。藉由此新方法而被萃取的脂質可使用不具另外的清除以及分離步驟(諸如，層析或酶消化[作用])的MALDI-TOF質譜法而受到直接分析。

[0434] 實施例12a. 在以壓作為引起媒介的萃取之後在

HFIP (PCT/HFIP)中個別的部分之檢驗。對RNA以及蛋白質分佈分析， $\sim 4 \times 10^7$ PC12 細胞係以PBS 被清洗一次、被懸浮於0.9 mL HFIP中且被轉移到一脈衝(PULSE)管。礦油(0.5 mL)係被添加以致最終體積至1.4 mL。二十個壓力週期係被施加於各個試樣。各個壓力週期由在35,000 psi 20秒鐘再加上在大氣壓力20秒鐘組成。在PCT之後，整個的試樣係被對等分成2根對蛋白質以及RNA複製試樣的管且在 $\sim 12,000g$ 被離心歷經15分鐘以分開相。在離心[分離]之後，非極性頂相層係被移除。界面層係被轉移到乾淨的管子、被短暫地離心且溶劑的任何帶出係被吸掉。溶劑係被轉移到乾淨的管子且在SpeedVac上被乾燥以移除溶劑。沈澱物(pellet)係被短暫地離心以便於殘留的溶劑的吸氣。對藉由SDS-PAGE的蛋白質顯示)，沈澱物(pellet)、界面以及經乾燥的溶劑部分係被溶解於具50 mM DTT的1mL Laemmli試樣緩衝液中。對RNA隔離，1 mL TRIZOL[®]試劑係被加到各個部分且用於從細胞中RNA萃取的標準TRIZOL[®]程序(protocol)係被採用。

[0435]對DNA分佈分析，200 mg凍結小鼠肝臟係如以上所述的用1.0 mL HFIP以及250 μ L礦油而被萃取。試樣係被分成相等複製且相係如以上所述的被分離。DNA係從一複製的沈澱物(pellet)、界面以及乾燥了的溶劑部分中使用Qiagen DNEASY[®]血液以及組織組根據製造者對於從細胞中DNA萃取的指示而被萃取。

[0436]從三個部分的RNA與DNA回收係由瓊脂糖凝膠

電泳而被比較。來自所有三個部分的蛋白質係藉由SDS-PAGE而被分離。大部分的蛋白質係從可溶相而被回收。由Qubit測定所定量的核酸回收證實沈澱物(pellet)以及界面一起佔~90%的RNA與DNA二者。

[0437]牛的脂肪組織係藉由PCT/HFIP而被萃取且被分離成三個部分。接著，脂質部分以及不溶解部分係被再萃取以確定是否任何另外的蛋白質可被再回收。被再萃取的試樣係藉由SDS-PAGE而可見且證實在一少量另外的蛋白質可從固態殘留物中而被回收的同時，無無可探測出的蛋白質可自脂質相中被回收。對從脂質相中蛋白質再萃取，350 mg牛的脂肪組織係藉由在不具礦油的1.05 mL HFIP中之PCT而被處理。在萃取以及離心[分離]之後，溶劑相係被移除，脂質相係被轉移到一乾淨的試管且沈澱物(pellet)以及界面係被匯集起來。然後，沈澱物(pellet)/界面部分以及脂質部分係以新的HFIP而被再萃取且在12,000 g被離心歷經10分鐘。溶劑係藉由在真空之下蒸發而被移除且產生的試樣係被溶入Laemmli試樣緩衝液中且受到SDS-PAGE。

[0438]以上實驗表示下列：1)在脂質層中沒有可探測出可萃取的蛋白質。2)極性溶劑相含有大部分的試樣蛋白質以及只是微量RNA與DNA。3) 沈澱物(pellet)以及界面二者含有RNA與DNA，就沈澱物(pellet)來說含有~70%經回收的核酸且就界面來說含有~20% (剩下~10%可從溶劑相在蒸發之後而被回收)。

[0439] **實施例12b.**大多數用於從組織中基因組DNA萃

取之簡單以及效率高的方法依靠蛋白質大範圍的酶消化[作用]以釋出完整的DNA。吾人證實在藉由具HFIP的PCT從細胞或組織中蛋白質的萃取之後，核酸部分可被處理用於DNA分離且證實高產率完整的基因組DNA可被回收。在經培養之哺乳動物細胞的一試樣中的蛋白質萃取之後，固體部分係使用DNEASY[®]組(Qiagen)而被處理用於DNA分離且回收係與直接地以DNEASY[®]組被萃取之一對照等分部分細胞相比。通常，此方法並不適合於完整的組織蛋白質之回收，因為該程序(protocol)需要大範圍的蛋白酶K消化[作用]以獲得最大的DNA產量。

[0440]經培養之哺乳動物細胞的相等等分部分係藉由壓力循環在HFIP中而被處理用於蛋白質以及DNA的萃取。二十個壓力週期係使用一BAROCYCLER[®](模式NEP3229或NEP2320)而被施加於各個試樣。各個壓力週期由在高壓(35,000 psi) 20秒鐘再加上在低壓(大氣壓力) 20秒鐘組成。蛋白質萃取物係被乾燥、被溶入IEF緩衝液且受到2D PAGE。然後，含有大部分的試樣之DNA與RNA的沈澱物(pellet)以及任何固體界面層係被處理用於核酸萃取。核酸回收係以使用用於DNA定量之QUANT-IT[™] dsDNA BR測定組的一Qubit螢光計(Invitrogen)而被測量。

[0441]結果證實DNA可容易地從固相中藉由一些買得到的試劑而被萃取，而且不具勞力密集試樣均質化的必要。此外，因為大部分的蛋白質已經從核酸部分中被萃取，在萃取的期間DNA降解的可能為十分低。

[0442]凍結小鼠肝臟(每試樣23 mg)係如以上被處理。在離心[分離]之後，蛋白質相係被乾燥且受到SDS-PAGE。DNA係使用DNEASY[®]組從固相中被萃取。對照組織係在以DNEASY[®]組根據製造者的指示之DNA分離以前以蛋白酶K而被消化。

表3：從肝臟組織以及細胞培養之DNA回收

試樣/方法	總DNA回收 (μg)
22 mg小鼠肝臟/ DNEASY [®] 單獨	21
22 mg小鼠肝臟/ PCT/HFIP再加上DNEASY [®]	6
經培養的細胞/ DNEASY [®] 單獨	22
經培養的細胞/ PCT/HFIP再加上DNEASY [®]	20

[0443]用於細胞破壞以及蛋白質萃取的PCT/HFIP方法之組合連同用於DNA純化之DNEASY[®]組引起十分良好之從細胞之DNA與蛋白質的同時回收。此外，相同的按序程序(protocol)係被成功地應用於從肝臟組織中的DNA萃取。蛋白質萃取物係藉由1D或2D PAGE而被分析且證實大量的蛋白質係從PCT/HFIP萃取物而被回收。使用組合方法從細胞培養之DNA回收係比得上具蛋白酶K消化[作用]之DNEASY[®]對照，然而，從組織試樣之DNA回收為約從對照所獲得之30% (表3)。

[0444]實施例12c.藉由PCT/HFIP之DNA萃取係適合於一各式各樣的試樣大小。PC12細胞係藉由離心[分離]而被成沈澱物、被懸浮於生理緩衝液中且被計數。1 x 10⁴ – 5 x

10^5 細胞的等分部分係藉由PCT在0.5-1.0 ml HFIP中而被萃取(各個試樣的最終體積係藉由礦油的添加而被調整到1.4 mL)。在於35 kpsi (在高壓20秒鐘、在大氣壓力20秒鐘)的20個週期之後，試樣係被轉移到離心管且在 $\sim 12,000$ g被迅速旋轉以分離相以及含DNA的不溶解部分之沈澱物(pellet)。DNA係從沈澱物(pellet)使用DNEASY[®]組(Qiagen)而被回收，作為細胞數量的函數之DNA回收係被顯示於第4圖中。結果證實藉由PCT/HFIP之DNA回收為效率高的，即使從具和10,000個細胞一樣少的組織也是。

[0445] 實施例12d. PCT/HFIP方法與其他市面上買得到用於RNA以及蛋白質同時萃取之方法的比較。C12細胞(每試樣 10^6 個細胞)係使用PCT/HFIP、來自Invitrogen的TRIZOL[®]試劑、來自Qiagen的ALLPREP[™] RNA/蛋白質組以及來自Ambion的PARIS[™]組而被處理。

[0446] 對PCT/HFIP萃取，二十個壓力週期係使用一BAROCYCLER[®](模式NEP3229或NEP2320)而被施加。各個壓力週期由在高壓(35,000 psi)20秒鐘再加上在低壓(大氣壓力)20秒鐘組成。在於HFIP的PCT萃取之後，含蛋白質的溶劑相係被乾燥、被溶解於試樣緩衝液中且受到SDS-PAGE分析作用。對RNA萃取，沈澱物(pellet)以及固體界面係藉由添加0.5mL的TRIZOL[®]而被匯集起來且被處理，且藉由標準TRIZOL[®]程序(protocol)萃取。其餘三種試樣係根據製造者的指示而被處理。從各個試樣中蛋白質萃取物的等量的等分部分係藉由SDS-PAGE而被分離。各個RNA試樣的最終

體積為100 μ L。各個RNA試樣的相等等分部分係在一凝膠上跑以證實RNA並未被降解。在瓊脂糖凝膠上顯著的28S以及18S核糖體RNA區帶的存在證實藉由所有四種方法所萃取的RNA並未被降解。總RNA回收係藉由而QUANT-IT™ RNA測定組而被測量。

[0447]為一主要是為RNA萃取而被設計之最佳試劑的TRIZOL®產生優良的RNA回收，但是用於從有機相中之蛋白質萃取以及清理的多步驟程序(protocol)為緩慢的，該多步驟程序(protocol)需要兩次沈澱步驟、三次在於95%乙醇中之300mM鹽酸胍中的30-分鐘清洗以及一最後20分鐘在乙醇中的清洗以從TRIZOL®試劑中除去酚以及染料。此大範圍的清理可在體外的蛋白質修飾[作用] (N-端，Lys)導致低於化學計量，該等在體外的蛋白質修飾[作用]可可能地與蛋白質轉譯後修飾的下游定量性分析相干擾。在其餘三種組易於使用的同時，從Ambion PARIS™組之RNA回收係始終如一地低於以任何其餘試劑者(表4)。此可能是由於在試樣分解之後，只有一半的溶胞產物用於RNA萃取，而其餘一半專供蛋白質之用。此外，因為在步驟的最後，蛋白質萃取物仍然在含有鹽類以及清潔劑的細胞破壞緩衝液中，額外的蛋白質清理步驟(諸如，透析[作用]或過濾)可被需要。使用Qiagen組的RNA回收與以TRIZOL®以及PCT/HFIP所獲得的相似，但是由於管柱的低結合能力，試樣(10^6 PC12細胞) 必須被分到2管柱上，增加工作量以及各個試樣的成本。又，由於所使用以將蛋白質部分從RNA分離之

ALLPREP™旋轉塔的性質，許多蛋白質與結合RNA部分留下且不在所回收的蛋白質部分。此外，因為藉由ALLPREP™程序(protocol)所收集的蛋白質部分含有與SDS-PAGE不相容的RNA安定緩衝液，蛋白質必須在可導致可能潛在的損失之SDS-PAGE分析以前被丙酮沈澱。

表4：用於同時總RNA與蛋白質回收之4種試劑的比較

方法	從10 ⁶ PC12細胞之總RNA回收
PCT/HFIP	11.9µg
Ambion PARIS™組	5.3 µg
Qiagen ALLPREP™組	11.4 µg
TRIZOL®	16.2 µg

[0448] **實施例12e.**證實使用新方法所回收的RNA部分不僅如藉由在凝膠上28S以及18SRNA的存在所指出為完整的，而且含有完整的mRNA且與RT-PCR相容，以上所述之四種RNA試樣受到使用β-肌動蛋白引物的即時定量-RT-PCR放大作用。與三種所試驗的標準方法相比，藉由PCT/HFIP從PC12細胞中所萃取的RNA非常有利的，表示試樣含有在所預期濃度之可放大的mRNA (表5)。

表5：RT-RT-PCR定量。用於同時RNA與蛋白質回收之4種試劑的比較

方法	從10 ⁶ PC12細胞之RNA回收
PCT/HFIP	16.4 µg
Ambion PARIS™組	9.0 µg
Qiagen ALLPREP™組	14.0 µg
TRIZOL® (Invitrogen)	14.0 µg

[0449] **實施例12f.**爲了說明以PCT作爲引起媒的介液液萃取方法去脂以及溶解某些在標準蛋白體試樣中一般未被充分代表之疏水性蛋白質的能力之特性，吾人使用兩種不同的萃取緩衝液再加上2D-PAGE分離、膠體內消化以及藉由LC-MS/MS的分析比較鼠科的白色脂肪組織之萃取。鼠科的腹脂之複製試樣係在藉由使用或PCT/HFIP溶劑系統或是以清潔劑爲基的萃取緩衝液(7M脲、2M硫脲、4% CHAPS)之壓力循環的類似條件之下被處理。

[0450] SDS-PAGE係在4-12%聚丙烯醯胺梯度凝膠上被進行。對於2D-PAGE分離，同時的還原反應以及藉由三正丁基膦/丙烯醯胺的烷化反應係被應用。固定pH值梯度長條pH值3-10係與試樣成水合物歷經6小時，再加上在10,000V的IEF歷經100,000瓦特-小時。所有預製電泳供應以及標準垂直凝膠電泳系統係來自Bio-Rad Laboratories (加州海克力斯)，而IsoelectriQ²綜合的IEF儀器係來自蛋白體系統(麻薩諸塞州溫本)。凝膠係以膠態考馬斯亮藍(CBB)或SYPRO[®] Ruby而被染色、被掃描以及以PDQuest軟體而被分析以確定統計學上有顯著差異地經萃取的蛋白質。經選擇的凝膠點係被切除且使用慣用膠體內消化程序(protocol)²⁶而被處理。經改質之豬的胰蛋白腴(威斯康辛州麥迪遜的Promega)的序列梯度用於消化。

[0451] 蛋白質消化液(5-10 μ L)係被加到一C₁₈固相萃取捕集塔(300 mm內徑x 5 mm，加州載安)以及100 μ m內徑x 12 cm 奈米-LC反相自行填充熔融二氧化矽塔上(PicoFrit，

被拉出的內徑 8 μ m 之尖端 (麻薩諸塞州溫本的 New Objective, Inc.)，靜止相：使用在 0.1% 甲酸中的乙腈之線性梯度之 Magic C18AQ, 3 μ m, 100Å (加州奧本市的 Michrom Bioresources)。洗析液係藉由奈米電噴霧而被引入或一 LTQ Orbitrap 或是 LCQ Deca XP Plus 質譜儀 (加州聖荷西的賽默飛世爾科技)。數據分析已經使用 SEQUEST- SORCERER™ 演算 [法] 在 SORCERER™ (加州聖荷西的 Sage-N Research) 搜尋引擎上被實施。該搜尋係對照著一連續“前進”以及“倒退” FASTA 數據庫而被進行。辨識結果係使用 Protein Prophet 以及 Peptide Prophet 平臺而被過濾且被確認。介於蛋白質識別數據的可靠性與敏感性之間的均衡係藉由把所估算的偽陽性蛋白質辨識比例調整到 $\leq 1\%$ 而被設定。

[0452] 一些蛋白質係在藉由 PCT/HFIP 所萃取之小鼠脂肪組織的 2D 凝膠上被辨識，其在以清潔劑所萃取的試樣中為不存在的或明顯地比較不大量的。這些包括鐵蛋白輕鏈、載脂蛋白 A1、超氧化物歧化酶 [Cu-Zn]、脂滴相關蛋白 (脂滴包被蛋白)、 α 烯醇化酶以及碳酸酐酶。

[0453] 實施例 12g. 來自以壓力循環作為引起媒介之 HFIP 萃取的脂質部分之直接應用與使用在正游離模式中的 DHB 基質之 MALDI-TOF 分析相容。脂質係藉由 PCT 使用如以上所述具礦油的 HFIP 從大鼠腦組織中被萃取。肉牛心包的脂肪係藉由不具所添加礦油的 PCT/HFIP 而被萃取。來自兩組織的液相受到 MALDI-TOF 分析。

[0454] 藉由 PCT/HFIP 所萃取的脂質部分並不需要進一

步清理方法(諸如，層析法)、額外的萃取步驟或酶消化[作用]，而是它可直接地藉由MALDI-TOF質譜法用於分析。藉由MALDI-TOF之脂質相磷脂以及甘油三酯分型(profiling)係如在前所述的被進行，具下列改變：脂質相部分的等分部分(0.5 μ L)係直接地被點到一2 μ L小滴的在50%乙腈/水中之0.5 M 2,5-二羥基苯甲酸(DHB)基質溶液上，其緊接著在小滴沈積在MALDI標的上之後。由於在有機溶劑中脂質溶液十分低的黏度以及表面張力，此試樣應用的方法避免穿過MALDI標的的多點位置之小滴的擴散。另外，一親水親油的溶劑在結晶基質混合物上之應用引起相對地均勻基質/試樣點之形成。數據係在一ABI 4700蛋白體分析儀(加州福斯特市的應用生物系統公司)上用正游離模式被收集。

[0455]結果指出藉由新方法所萃取的脂質代表各式各樣的脂質類型且為充分地純化以不具另外的純化步驟而被直接地分析。組織特異脂質光譜係從兩種不同的組織而被獲得。腦試樣的磷脂特性在大鼠腦萃取物中為明顯的，但是是牛的脂肪組織之脂質組成物所沒有的。

[0456] **實施例12h.**為進一步證實PCT/HFIP萃取方法的效用，來自5種不同大鼠組織之蛋白質、RNA以及DNA的按序萃取係被進行。

[0457]急驟凍結大鼠組織(264mg腎臟、330mg腹脂墊、310 mg肝臟、264mg腦、200mg心肌)係每試樣使用1.0 mL HFIP以及150-200 μ L礦油而被處理。二十個壓力週期係使用一BAROCYCLER[®](模式NEP3229或NEP2320)而被施加於

各個試樣。各個壓力週期由在高壓(35,000 psi) 20秒鐘再加上在低壓(大氣壓力)20秒鐘組成。在PCT以及離心[分離]之後，各個蛋白質部分的10%等分部分係已準備好SDS-PAGE。來自各個試樣的沈澱物(pellet)以及界面部分係被匯集起來、被溶解於0.5 mL TRIZOL[®]中、被充分地漩渦化以及根據用於從細胞中RNA以及DNA之萃取的標準TRIZOL[®]程序(protocol)而被處理。

[0458]藉由SDS-PAGE所分離之含蛋白質的部分在各個試樣中展現組織特異蛋白質型式。瓊脂糖凝膠電泳證實RNA如以上藉由28S以及18S核糖體RNA的存在所表示的為完整的。使用用於將RNA以及DNA從固相的分離之TRIZOL[®]程序(protocol)，吾人證實基因組DNA以及完整的總RNA二者可在蛋白質萃取之後藉由PCT/HFIP而被分離(表6)。

[0459]結果證實以PCT/HFIP作為引起媒介之組織破壞以及萃取可供從各種各樣的組織之蛋白質、完整的RNA以及基因組DNA效率高的回收之用。

表6：從細胞以及組織的RNA以及DNA回收

組織	每mg組織或10 ⁶ 細胞之RNA回收	每mg組織或10 ⁶ 細胞之DNA回收
大鼠肝臟	2.40 µg	34.5 ng(140 ng*)
大鼠腎臟	0.70 µg	35.5 ng
大鼠脂肪組織	0.02 µg	0.67 ng
大鼠腦	0.55 µg	37.08 ng
大鼠心肌	0.34 µg	12.80 ng
PC12細胞	11.90 µg	10.70 µg*

* PCT/HFIP 蛋白質萃取通常後面是使用 TRIZOL[®] 試劑 (或 DNEASY[®]組，所指定之處*)的RNA與DNA分離。

[0460] 本發明一些具體實施例已經被描述。然而，當然數種變化將被形成而不脫離本發明的精神與範疇。

【符號說明】 (無)

I683821

發明摘要

※ 申請案號：106114649（由097120568分割）

※ 申請日：97.6.3

※ I P C 分類：***G07K 1/14*** (2006.01)

G12M 1/42 (2006.01)

B01D 11/04 (2006.01)

【發明名稱】（中文/英文）

分子萃取及分配技術

EXTRACTION AND PARTITIONING OF MOLECULES

【中文】

自多數組分萃取一有興趣的組分之方法係被描述。

【英文】

Methods of extracting a component of interest from a plurality of components are described.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 3 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：（無）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

申請專利範圍

1. 一種自多數組分萃取一有興趣的組分之壓力輔助液-液萃取方法 (pressure-assisted liquid-liquid extraction method)，該方法包含：

提供一混合物，該混合物包含一包括多數組分之試樣及一兩親的溶劑(an amphiphilic solvent)，其中該多數組分包含一有興趣的組分且其中該混合物係無界面活性劑及/或清潔劑；以及

使該混合物受到一壓力週期以加速相分離，該壓力週期包含：

將該混合物暴露於一第一液體靜壓力；

將該混合物暴露於一第二液體靜壓力以促進該試樣之分級分離成多數組分，其中該第二液體靜壓力係大於該第一液體靜壓力；以及

將壓力自該第二液體靜壓力減低，以造成由該溶劑及多數試樣組分形成至少兩液相，藉此該有興趣的組分係被分配到該至少兩液相中之一者內以從該多數組分中萃取該有興趣的組分。

2. 如請求項1之方法，其中該有興趣的組分為至少一蛋白質、脂質、核酸、或小分子。
3. 如請求項1之方法，其中多數組分係被分配到一實質上無該有興趣的組分之液相。
4. 如請求項1之方法，其進一步包含自該液相將該有興趣的組分單離。

5. 如請求項1之方法，其中該經萃取之有興趣的組分係直接地與一下游程序相容。
6. 如請求項1之方法，其中該多數組分具有生物起源。
7. 如請求項6之方法，其中該具有生物起源之多數組分係來自一動物、真菌、細菌、病毒或植物。
8. 如請求項1之方法，其中該第二壓力係被減壓成一第三壓力，且其中該等第一、第二以及第三液體靜壓力組成該壓力週期。
9. 如請求項8之方法，其中該混合物係暴露於經重複之壓力週期。
10. 如請求項9之方法，其中該混合物係暴露於介於約1以及約1000之間的壓力週期。
11. 如請求項10之方法，其中該第三液體靜壓力係小於該第一液體靜壓力。
12. 如請求項10之方法，其中該第三液體靜壓力係等於該第一液體靜壓力。
13. 如請求項10之方法，其中該第三液體靜壓力係大於該第一液體靜壓力。
14. 如請求項1之方法，其中該第一液體靜壓力係介於約0.1 MPa至約1,000 MPa之間。
15. 如請求項1之方法，其中該有興趣的組分係核酸、細菌、殺蟲劑(pesticide)、多醣、多酚、維生素、毒素、污染物、脂質、糖脂(glycolipid)、類固醇、薄膜、存在於一細菌包含體中的一有興趣的組分、抗原、病毒、藥學試

劑、代謝物、藥物、藥物代謝物、染料、食品成分、奈米粒子配方、脂筏、澱粉斑塊(amyloid plaque)、微管、細胞溶質或一特定細胞類型。

16. 如請求項1之方法，其中有多數有興趣的組分係從該多數組分中被萃取。
17. 如請求項16之方法，其中該多數有興趣的組分包含一核酸及一蛋白質。
18. 如請求項1之方法，其中該多數組分提供一液相或多數液相。
19. 如請求項18之方法，其中該液相係一脂質、一有機溶劑、一水性緩衝液、一乳膠或固體粒子的一懸浮液。
20. 如請求項18之方法，其中該液相係自一固相在液體靜壓力下形成。
21. 如請求項14之方法，其中該第二液體靜壓力係介於約100 kPa以及約1,000 MPa之間。
22. 如請求項1之方法，其中該第一及第二液體靜壓力之間的壓力差異係介於約10 kPa以及1 GPa之間。
23. 如請求項1之方法，其中該溶劑包含HFIP、TFE、PFOA、三氟乙酸或其他鹵代醇或酸。
24. 如請求項1之方法，其中從該多數組分中萃取該有興趣的組分包含加速親脂性以及親水化合物之分離成可接著被機械性分離的兩或更多液相。