

(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
2014 年 3 月 27 日 (27.03.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/044062 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12M 1/00 (2006.01) C12P 21/06 (2006.01)
C07K 1/04 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/076942
- (22) 国际申请日: 2013 年 6 月 7 日 (07.06.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210349969.0 2012 年 9 月 20 日 (20.09.2012) 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)。 赵群 (ZHAO, Qun); 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)。 梁玉 (LIANG, Yu); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 梁振 (LIANG, Zhen); 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, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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))。

(54) Title: DUAL PHASE COLUMN MEMBRANE PROTEIN MICRO-REACTOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 双相柱膜蛋白质微反应器及其应用

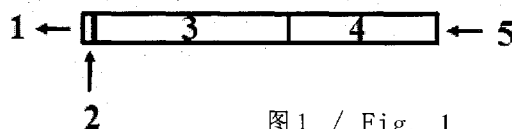


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: The present invention relates to a dual phase column membrane protein micro-reactor which can achieve acidic and alkalinity displacements for a reaction system; the micro-reactor uses a cation exchange material and an anion exchange material as stationary phases, the two stationary phases being sequentially filled into the same container, and can achieve sample pretreatment processes of trapping in situ, pH displacement, reduction, alkylation, enzymolysis of the membrane protein sample. The device has advantages of a high recovery rate, being simple, efficient, fast and so on.

(57) 摘要: 本发明涉及一种可实现反应体系酸碱性置换的双相柱膜蛋白质微反应器, 该微反应器以阳离子交换材料和阴离子交换材料作为固定相, 将两种固定相顺序填充于同一容器内, 可实现膜蛋白质样品原位捕集、pH 置换、还原、烷基化、酶解的样品预处理过程。该装置具有回收率高、简单、高效、快速等优点。



WO 2014/044062 A1

双相柱膜蛋白质微反应器及其应用

技术领域

本发明涉及一种双相柱膜蛋白质微反应器，可实现膜蛋白质原位富集、pH 置换、还原、烷基化、酶解的样品预处理过程，并且与分离、检测系统联用，即可实现对膜蛋白质酶解产物的分离、鉴定。

背景技术

细胞膜是细胞对外界的屏障和细胞内外物质交换的枢纽，它将细胞与周围环境隔离开，维持细胞内环境的稳定。细胞膜蛋白质组对执行细胞内外物质交换、细胞识别与免疫应答、信号传导和调控以及能量传递等功能起着重要作用。真核生物中 1/3 的蛋白均整合在膜上。膜蛋白质在药物研究中也起着相当重要的作用，在已知的和正在研究的药物靶标中大约有 70% 为膜蛋白质。然而，由于膜蛋白质疏水性强，导致其溶解性和酶解效率较差，对目前通用的蛋白质组学技术提出了挑战。

甲酸是一种很好的膜蛋白质增溶剂，后续的酶解通常采用化学裂解剂溴化氰或酸性胃蛋白酶。然而，溴化氰是一种剧毒试剂，且只能在甲硫氨酸处裂解，产生的肽段较大，不利于质谱检测。胃蛋白酶是一种非特异性的蛋白质水解酶，因此在质谱数据检索时，产生的理论酶切肽段列表太大，对用于数据检索的服务器要求高，数据检索时间过长，数据检索的假阳性率高，严重地影响了膜蛋白质的鉴定。胰蛋白酶专一性强，酶切后得到的肽片段大小适中，分子质量在 500-3000 Da 之间，非常适合质谱的检测范围，是蛋白质鉴定中应用最多的蛋白水解酶。因此，将甲酸的强溶解能力和胰蛋白酶的专一性酶切相结合，对于膜蛋白质分析有着重要意义。

目前，有文献通过将甲酸溶解后的膜蛋白质溶液，用碳酸氢铵调节 pH 至 pH=8 后，进行后续的蛋白质的酶解 (Cruz, S.D., Xenarios, I., Langridge, J., Vilbois, F., Parone, P.A., Martinou, J. C., *J. Biol. Chem.* 2003, 42, 41566 - 41571.)。这种方法的问题在于：一、操作不方便；二、膜蛋白质的浓度被严重稀释；三、酸、碱性置换过程易造成膜蛋白质的再次析出；四、离心管内进行操作，内壁吸附损失较大；五、无法实现在线分析。

发明内容

为了解决上述问题，本发明的目的在于发展一种双相柱膜蛋白质微反应器 (图 1)，通过该微反应器富集膜蛋白质样品，在不稀释样品的前提下，便捷、高回收率、原位地实现膜蛋白质样品所处环境酸、碱性的置换，确保酸性条件下溶解和碱性条件下酶解的兼容 (图 2)。此外，该样品预处理过程均在毛细管柱原位进行，可实现膜蛋白质样品预处理的在线、自动化操作。

为实现上述目的，本发明采用的技术方案为：

双相柱膜蛋白质微反应器：

包括中空的容器，于中空的容器内顺次填充阴离子交换材料、阳离子交换材料、或顺次

填充阳离子交换材料、阴离子交换材料，于中空的容器内部空腔的一端或两端设置有柱塞；所述中空的容器为圆柱、圆锥或圆盘形容器，中空容器的内部空腔径向横截面直径为 50 μm -5 cm。

5 容器为：20-1000 μl 移液器枪头，1-20 ml 固相萃取（SPE）管，1-20 ml 注射器针管，50-500 μm 内径毛细管或注射器滤膜腔体。

柱塞是在微反应器内原位合成的整体柱柱塞或孔径为 3 nm-20 μm 的筛板。

同一容器内包含阴离子交换材料、阳离子交换材料；

10 阳离子交换材料为含有磺酸基团和/或磷酸基团的强阳离子交换材料、或含有羧基基团的弱阳离子交换材料；阴离子交换材料为含有季铵基团的强阴离子交换材料、或含有仲胺和/或叔胺基团的弱阴离子交换材料；材料可以是颗粒材料或者整体材料。

阳、阴离子交换材料的搭配可以是：强阳离子交换材料和强阴离子材料；强阳离子交换材料和弱阴离子交换材料；弱阳离子交换材料和强阴离子交换材料；弱阳离子交换材料和弱阴离子交换材料。

所述双相柱膜蛋白质微反应器的应用：

15 1) 在带有柱塞的横截面直径为 50 μm -5 cm 的圆柱、圆锥或圆盘形容器内顺次填充阴、阳离子交换材料或阳、阴离子交换材料；

2) 采用 pH 为 1-7 的酸性溶液或 pH 为大于 7-14 的溶有质量或体积浓度为 1%-30% 的表面活性剂或去垢剂的碱性溶液溶解膜蛋白质样品，将样品溶液通过微反应器实现膜蛋白质的原位捕集；

20 3) 然后，通入 pH 为大于 7-14 的碱性溶液或 pH 为 1-7 的酸性溶液进行微反应器内溶液体系的 pH 值的置换；

4) 之后，用还原剂进行蛋白质的还原，随后用烷基化试剂进行蛋白质的烷基化处理，最后在 pH 为大于 7-14 的碱性条件下进行蛋白质的酶解或 pH 为 1-7 的酸性条件下进行蛋白质的酶解；

25 5) 酶解完成后，用 200-2000 mM 的盐溶液将膜蛋白质的酶解肽段从微反应器上洗脱下来，收集洗脱液，用液相色谱法分离，质谱、紫外或荧光检测器进行检测。

pH 为 1-7 的酸性溶液可为甲酸、三氟乙酸、三氯乙酸或醋酸溶液；

表面活性剂为十二烷基磺酸钠、脱氧胆酸钠、Triton X-100、chaps、Rapigest SF、或 NP-40d；去垢剂可为尿素、硫脲、或盐酸胍；

30 pH 为大于 7-14 的碱性溶液可为碳酸氢铵缓冲盐溶液、磷酸缓冲盐溶液、或三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液；

溶解蛋白质的溶剂可以是 pH 为 1-7 的酸性溶剂，也可以是 pH 为大于 7-14 的碱性溶剂；

如果是酸性条件下捕集，则填装顺序为：载流液流入端为阳离子交换材料，载流液流出端为阴离子交换材料；

35 如果是碱性条件下捕集，则填装顺序为：载流液流入端为阴离子交换材料，载流液流出端为阳离子交换材料。

若在酸性条件下捕集,则用 pH 为大于 7-14 的碱性溶液置换 pH 值,溶液浓度范围在 1-100 mM 之间;

若在碱性条件下捕集,则用 pH 为 1-7 的酸性溶液置换 pH 值,溶液浓度范围在 1-100 mM 之间。

5 还原剂为二硫苏糖醇 (DTT)、磷酸三氯乙酯 (TCEP) 或 β -巯基乙醇;浓度为 1-200 mM。
烷基化试剂为碘代乙酸或碘乙酰胺;浓度为 1-200 mM;

pH 为大于 7-14 的碱性条件下进行蛋白质的酶解选择胰蛋白酶、内肽酶 Arg-C、内肽酶 lys-C、胰凝乳蛋白酶或弹性蛋白酶中的一种或几种;用量为蛋白质样品质量的 1/100 -1/10;

10 pH 为 1-7 的酸性条件下进行蛋白质的酶解选择胃蛋白酶或溴化氰试剂;用量为蛋白质样品质量的 1/100 -1/10。盐溶液为碳酸氢铵溶液、氯化钠溶液、乙酸铵溶液、磷酸盐溶液、或三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液。

膜蛋白质捕集于微反应器后,后续的膜蛋白质的还原、烷基化、酶解过程均在微反应器内原位进行。

15 1、双相柱膜蛋白质微反应器的构建:在一根毛细管中,原位合成整体材料作为柱塞,然后顺次填装强阴离子交换材料和强阳离子交换材料作为微反应器的固定相。

2、酸、碱性的置换:膜蛋白质样品溶解于甲酸溶液,并捕集于双相柱膜蛋白质微反应器后,通入 1-50mM 碳酸氢铵缓冲液,可便捷、高回收率地将微反应器溶液体系置换为碱性环境,从而有利于后续膜蛋白质的还原、烷基化及酶解过程。反应体系酸、碱性置换过程简单、快速,同时可保持样品的高回收率。

20 本发明具有如下优点:

1. 双相柱膜蛋白质微反应器的制备简单。在同一容器中,顺序填装保留机理具有正交性质的两种离子交换填料或原位顺序合成保留机理具有正交性质的离子交换整体材料,即可制得双相柱膜蛋白质微反应器。

25 2. 操作方便、快捷。利用在同一容器内填装保留机理具有正交性质的两种离子交换材料,通入相应 pH 值的缓冲液,即可方便、高回收率地实现蛋白质样品溶解酸、碱性和蛋白质样品处理所需碱、酸性间的置换,并且用 pH 试纸即可检测置换过程中 pH 的状态。

30 3. 高回收率。采用两种保留机理正交的离子交换材料,可保证膜蛋白质样品在 pH 置换过程中,很好地保留在微反应器中。从而,避免 pH 值置换过程中,因膜蛋白质保留行为的变化造成的损失(图 3)。此外,整个样品预处理过程均在微反应器内原位进行,避免了转移、试管内壁吸附等造成的损失,回收率高(图 4)。

4. 利用双相柱膜蛋白质微反应器,在膜蛋白质样品无需稀释的情况下,实现了膜蛋白质的甲酸溶解和胰蛋白酶酶切两种策略的兼容。本发明使用体积分数为 90%的甲酸溶解膜蛋白质,稀释至甲酸浓度至 1%后,将膜蛋白质样品捕集于双相柱上,通入碳酸氢铵缓冲液,将 pH 值置换到 7-8,满足后续膜蛋白质的还原、烷基化及胰蛋白酶酶切过程所需缓冲条件。

35 5. 样品预处理时间短。本发明基于微反应器的原位样品预处理,无需其他的转移、冻干等过程,整个样品预处理时间可控制在 2-4 小时内。

附图说明

图 1 为双相柱膜蛋白质微反应器示意图。1：载流液流出端； 2：亲水性柱塞； 3：强阴离子交换填料； 4：强阳离子交换填料； 5：载流液流入端；

图 2 为双相柱膜蛋白质微反应器的样品预处理流程图。7：膜蛋白质样品； 8：甲酸溶解膜蛋白质样品； 9：置换 pH 值于 7-8，并完成还原、烷基化及蛋白质的胰蛋白酶酶解过程。

图 3 为 SDS-PAGE 评价双相柱膜蛋白质微反应器，酸性上样、置换 pH 至碱性过程中的样品保留情况。以酸性、中性、碱性蛋白质 BSA、Myo、Cyt C 的混合物作为样品。条带 1：Marker；条带 2：BSA、Myo、Cyt C 三个蛋白质；

条带 3：双相柱膜蛋白质微反应器的上样流出液；条带 4：SCX 微反应器的上样流出液；条带 5：双相柱膜蛋白质微反应器 pH 置换的流出液；条带 6：SCX 微反应器 pH 置换的流出液。

图 4 用反相捕集柱除盐的峰面积评价微反应器样品预处理的回收率。A：自由溶液酶解等浓度的 BSA、Myo、Cyt C 蛋白溶液，酶解产物的反相除盐峰面积的标准曲线；B：4 μ g 等浓度 BSA、Myo、Cyt C 蛋白用甲酸溶解，经双相柱膜蛋白质微反应器样品预处理后，所得酶解产物的回收率。

具体实施方式

1. 双相柱膜蛋白质微反应器的制备：按图 1 所示，在 200 μ m i.d. 毛细管中，原位合成亲水性整体柱塞 2，步骤如下：（1）毛细管预处理。将毛细管分别用浓度为 1M 的氢氧化钠溶液、水、浓度为 1M 的盐酸溶液、水、甲醇冲洗，然后 70℃ 下氮气吹干；然后，将 γ -MAPS（ γ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷）的无水甲醇溶液（体积比 1:1）灌入毛细管内，用硅胶将两端密封后，在室温下静置反应 24 h。反应结束后，用无水甲醇将毛细管内残留的 γ -MAPS 冲洗干净，室温下氮气吹干。（2）亲水性柱塞的制备。称取 PEGDA（聚乙二醇二丙烯酸酯）0.1500 g，AIBN（偶氮二异丁腈）0.0015 g，正丙醇 0.3500 g，混匀得到聚合溶液，吹氮气 30 s，以除去其中的氧气，将预处理过的毛细管一端浸入聚合溶液中，聚合溶液通过毛细虹吸作用吸入预处理过的毛细管中约 5 cm 后，用硅胶将两端密封，放入水浴锅中 50℃ 反应 24 小时。柱塞合成后，顺序填装 2 厘米的强阴离子交换填料 3（日本东曹达，TSK-GEL SuperQ-5PW, 10 μ m, 1000 Å）和 2 厘米的强阳离子交换填料 4（日本东曹达，TSK-GEL SP-5PW, 10 μ m, 1000 Å）。

2. 评价双相柱膜蛋白质微反应器的样品预处理的效率：以酸、中、碱性三种标准蛋白 BSA、Myo、Cyt C 的混合物作为样品。用体积分数为 90% 的甲酸溶液等质量浓度溶解，90℃ 下热变性 10 min 后，将上述溶液稀释至甲酸浓度为 1%（体积分数），以满足强阳离子交换填料的解离条件。随后，将蛋白质样品捕集于微反应器，用 5 mM 碳酸氢铵缓冲液置换 pH 值于 7.5。继而，通入 100 mM 二硫苏糖醇（DTT）溶液，在室温下反应 30 min 进行蛋白质的还原处理后，通入 10 mM 碘乙酰胺（IAA）溶液，室温下避光反应 30 min 后进行蛋白质的烷基化处理。最后，通入 2 mg/mL 的胰蛋白酶的 5 mM 碳酸氢铵溶液，液封住毛细管两端，37℃ 酶解 1-2 小时。酶解结束后，将微反应器用二通与反相分离柱（内径 75 μ m i.d.，长 17cm，含 2cm 的喷针，

填料为美国菲罗门，Luna C18 (2)，5 μm ，100 $\text{\AA}$) 串连，与质谱联用，对酶解肽段进行一维液相分离、质谱鉴定。

作为对照组，我们用常规自由溶液酶解的方法对上述样品（等质量 BSA、Myo、Cyt C 的混合物）进行样品预处理。首先，用 1mL 碳酸氢铵缓冲液（50 mM，pH 8）溶解 1 mg BSA、Myo、Cyt C 的混合物（三种蛋白按等质量比混合），90℃下热变性 10 min 后，加入 10 mM 二硫苏糖醇（DTT）溶液，56℃下，反应 2h 进行蛋白质的还原处理。随后，通入 25 mM 碘乙酰胺（IAA）溶液，室温下避光反应 30 min 进行蛋白质的烷基化处理。最后，加入 25 μg 的胰蛋白酶（溶于 50 mM 碳酸氢铵溶液，pH 8）进行蛋白质的酶解。37℃酶解 12 小时后，加入终体积为 1% 的甲酸溶液终止酶解。

从双相柱膜蛋白质微反应器和自由溶液的样品预处理结果看，采用以上两种策略，蛋白质的还原、烷基化效率（表 1）及酶解效率（表 2）都是相当的。

3. 基于双相柱膜蛋白质微反应器的鼠脑膜蛋白质样品的分析：用体积分数为 90% 的甲酸溶解鼠脑膜蛋白质样品，90℃下热变性 10 min 后，将上述溶液稀释至甲酸浓度为 1%（体积分数），以满足强阳离子交换填料的解离条件。随后，将膜蛋白质样品捕集于微反应器，用 5 mM 碳酸氢铵缓冲液置换 pH 值于 7.5，通入 100 mM DTT 溶液进行蛋白质的还原处理，在室温下反应 30 min 后，通入 10 mM IAA 溶液进行蛋白质的烷基化处理，室温下避光反应 30 min。随后，通入 2 mg/mL 的胰蛋白酶的 5 mM 碳酸氢铵溶液，液封住毛细管两端，37℃酶解 2h。酶解结束后，将微反应器用二通与强阳离子交换捕集柱和反相分离柱（内径 75 μm i.d.，长 17cm，含 2cm 的喷针，填料为美国菲罗门，Luna C18 (2)，5 μm ，100 $\text{\AA}$) 串连，并与质谱联用，对鼠脑膜蛋白质的酶解肽段进行二维液相分离、质谱鉴定。

4. 数据分析：对采集的谱图进行数据库检索和数据分析。从结果看，鉴定到 975 个蛋白 group，对应于 3841 条非冗余肽段。其中，416 个膜蛋白质，其比例占鉴定到的总蛋白质的 43%。此外，鉴定到 103 条跨膜肽段。

表 1 BSA 的双相柱膜蛋白质微反应器较自由溶液的还原、烷基化结果

双相柱微反应器的酶解产物	自由溶液的酶解产物
K. VASLRETYGDMADCCEK. Q	R. ETYGDMADCCEK. Q
K. VASLRETYGDMADCCEKQEPER. N	K. YNGVFQECCQAEDK. G
R. ETYGDMADCCEK. Q	K. YNGVFQECCQAEDKGAACLLPK. I
R. ETYGDMADCCEKQEPER. N	K. VHKECCHGDLLECADDR. A
R. RHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDK. G	K. VHKECCHGDLLECADDRADLAK. Y

K. YNGVFQECCQAEDK. G	K. ECCHGDLLECADDR. A
K. YNGVFQECCQAEDKGACLLPK. I	K. ECCHGDLLECADDRADLAK. Y
K. VHKECCHGDLLECADDRADLAK. Y	K. EYEATLEECCA. D
K. ECCHGDLLECADDR. A	K. EYEATLEECCA KDDPHACYSTVFDK. L
K. ECCHGDLLECADDRADLAK. Y	R. CCTKPESER. M
K. LKECCDKPLLEK. S	K. CCTESLVNR. R
K. EYEATLEECCA. D	K. CCAADDKEACFAVEGPK. L
K. EYEATLEECCA KDDPHACYSTVFDK. L	
R. CCTKPESER. M	
K. CCTESLVNR. R	
R. CCTKPESERMPCTEDYLSLILNR. L	
K. TVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPK. L	
K. CCAADDKEACFAVEGPK. L	

表 2 双相柱膜蛋白质微反应器较自由溶液的酶解结果

	鉴定的序列覆盖率	
	双相柱膜蛋白质微反应器	自由溶液
BSA	81%	80%
Myo	94%	94%
Cyt C	65%	63%

权 利 要 求 书

1. 双相柱膜蛋白质微反应器，其特征在于：

包括中空的容器，于中空的容器内顺次填充阴离子交换材料、阳离子交换材料、或顺次填充阳离子交换材料、阴离子交换材料，于中空的容器内部空腔的一端或两端设置有柱塞；

5 所述中空的容器为圆柱、圆锥或圆盘形容器，中空容器的内部空腔径向横截面直径为 50 μm -5 cm。

2. 根据权利要求 1 所述的双相柱膜蛋白质微反应器，其特征在于：容器为：20-1000 μl 移液器枪头，1-20 ml 固相萃取（SPE）管，1-20 ml 注射器针管，50-500 μm 内径毛细管或注射器滤膜腔体。

10 3. 根据权利要求 1 所述的双相柱膜蛋白质微反应器，其特征在于：柱塞是在微反应器内原位合成的整体柱柱塞或孔径为 3 nm-20 μm 的筛板。

4. 根据权利要求 1 所述的双相柱膜蛋白质微反应器，其特征在于：同一容器内包含阴离子交换材料、阳离子交换材料；

15 阳离子交换材料为含有磺酸基团和/或磷酸基团的强阳离子交换材料、或含有羧基基团的弱阳离子交换材料；阴离子交换材料为含有季铵基团的强阴离子交换材料、或含有仲胺和/或叔胺基团的弱阴离子交换材料；材料可以是颗粒材料或者整体材料。

5. 根据权利要求 1 或 4 所述的双相柱膜蛋白质微反应器，其特征在于：阳、阴离子交换材料的搭配可以是：强阳离子交换材料和强阴离子材料；强阳离子交换材料和弱阴离子交换材料；弱阳离子交换材料和强阴离子交换材料；弱阳离子交换材料和弱阴离子交换材料。

20 6. 一种权利要求 1 所述双相柱膜蛋白质微反应器的应用，其特征在于：

1) 在带有柱塞的横截面直径为 50 μm -5 cm 的圆柱、圆锥或圆盘形容器内顺次填充阴、阳离子交换材料或阳、阴离子交换材料；

25 2) 采用 pH 为 1-7 的酸性溶液或 pH 为大于 7-14 的溶有质量或体积浓度为 1%-30% 的表面活性剂或去垢剂的碱性溶液溶解膜蛋白质样品，将样品溶液通过微反应器实现膜蛋白质的原位捕集；

3) 然后，通入 pH 为大于 7-14 的碱性溶液或 pH 为 1-7 的酸性溶液进行微反应器内溶液体系的 pH 值的置换；

30 4) 之后，用还原剂进行蛋白质的还原，随后用烷基化试剂进行蛋白质的烷基化处理，最后在 pH 为大于 7-14 的碱性条件下进行蛋白质的酶解或 pH 为 1-7 的酸性条件下进行蛋白质的酶解；

5) 酶解完成后，用 200-2000 mM 的盐溶液将膜蛋白质的酶解肽段从微反应器上洗脱下来，收集洗脱液，用液相色谱法分离，质谱、紫外或荧光检测器进行检测。

7. 根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于：pH 为 1-7 的酸性溶液可为甲酸、三氟乙酸、三氯乙酸或醋酸溶液；

35 表面活性剂为十二烷基磺酸钠、脱氧胆酸钠、Triton X-100、chaps、Rapigest SF、或

NP-40d; 去垢剂可为尿素、硫脲、或盐酸胍;

pH 为大于 7-14 的碱性溶液可为碳酸氢铵缓冲盐溶液、磷酸缓冲盐溶液、或三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液;

溶解蛋白质的溶剂可以是 pH 为 1-7 的酸性溶剂, 也可以是 pH 为大于 7-14 的碱性溶剂;

5 如果是酸性条件下捕集, 则填装顺序为: 载流液流入端为阳离子交换材料, 载流液流出端为阴离子交换材料;

如果是碱性条件下捕集, 则填装顺序为: 载流液流入端为阴离子交换材料, 载流液流出端为阳离子交换材料。

8. 根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于: 若在酸性条件下捕集, 则用 pH 为大于 7-14 的碱性溶液置换 pH 值, 溶液浓度范围在 1-100 mM 之间;

若在碱性条件下捕集, 则用 pH 为 1-7 的酸性溶液置换 pH 值, 溶液浓度范围在 1-100 mM 之间。

9. 根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于:

还原剂为二硫苏糖醇 (DTT)、磷酸三氯乙酯 (TCEP) 或 β -巯基乙醇; 浓度为 1-200 mM。

15 烷基化试剂为碘代乙酸或碘乙酰胺; 浓度为 1-200 mM;

pH 为大于 7-14 的碱性条件下进行蛋白质的酶解选择胰蛋白酶、内肽酶 Arg-C、内肽酶 Lys-C、胰凝乳蛋白酶或弹性蛋白酶中的一种或几种; 用量为蛋白质样品质量的 1/100 -1/10;

20 pH 为 1-7 的酸性条件下进行蛋白质的酶解选择胃蛋白酶或溴化氰试剂; 用量为蛋白质样品质量的 1/100 -1/10。盐溶液为碳酸氢铵溶液、氯化钠溶液、乙酸铵溶液、磷酸盐溶液、或三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液。

10. 根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于: 膜蛋白质捕集于微反应器后, 后续的膜蛋白质的还原、烷基化、酶解过程均在微反应器内原位进行。

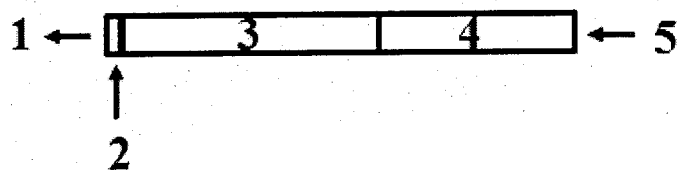


图 1

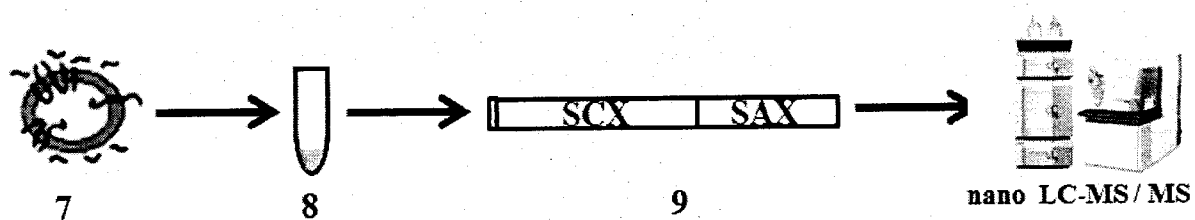


图 2

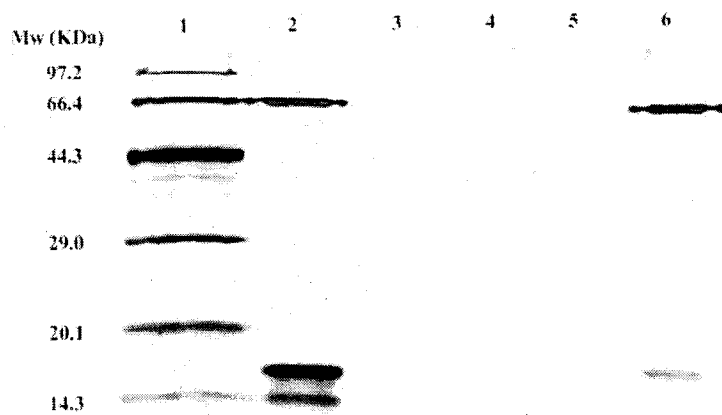
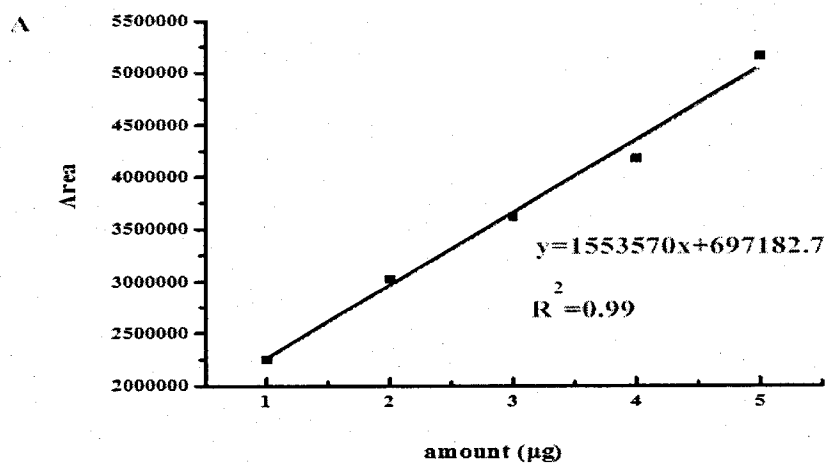


图 3



B

原始上样量 (μg)	4.00
双相柱微反应器样品预处理后肽段量 (μg)	3.73 ± 0.15
双相柱微反应器样品预处理回收率	93.3%

图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/076942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: C12M 1-; C07K 1-; C12P 21-

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)

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI: biphasic column, membrane protein, reactor, cation material, anion material, plunger, container, hollow, two, dimensional, separation, column, anion, cation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAO, Qian; Study of the Thermal Expansion Pump for Capillary HPLC and New Methodologies for Protein Micro-separation, SCIENCE-ENGINEERING (A), CHINA DOCTORAL DISSERTATIONS FULL-TEXT DATABASE, 15 January 2012 (15.01.2012), 2012, no. 1, B014-26, see page 119, 5.2.1, page 120, 5.2.5, figures 5-1, and pages 121-122	1-10
A	ZOU, Hanfa et al.; Recent developments in preparation of monolithic columns and their applications in proteomic analysis, CHINESE JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, September 2009, vol. 27, no. 5, pages 526-536, see the whole document	1-10
A	CN 102236003 A (FUDAN UNIVERSITY), 09 November 2011 (09.11.2011), see the whole document	1-10

☐ 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
26 August 2013 (26.08.2013)

Date of mailing of the international search report
12 September 2013 (12.09.2013)

Name and mailing address of the ISA/CN:
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

ZHANG, Bin

Telephone No.: (86-10) **61648321**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/076942

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102236003 A	09.11.2011	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/076942

CONTINUATION OF SECOND SHEET: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/00 (2006.01) i

C07K 1/04 (2006.01) i

C12P 21/06 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2013/076942

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC : C12M 1-; C07K 1-; C12P 21-

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))

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI: 双相柱, 膜蛋白, 反应器, 阳离子材料, 阴离子材料, 柱塞, 容器, 中空, two, dimensional, separation, column, anion, cation

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
A	陶芊, 毛细管液相色谱热膨胀泵及蛋白质微分离新方法研究, 中国博士学位论文 全文数据库工程科技 I 辑, 15.01 月 2012 (15.01.2012), 2012 年第 1 期, B014-26 参见第 119 页 5.2.1, 第 120 页 5.2.5, 图 5-1, 第 121-122 页	1-10
A	邹汉法等, 整体柱制备技术的新进展及其在蛋白质组学中的应用, 色谱, 9 月 2009, 第 27 卷, 第 5 期, 第 526-536 页 参见全文	1-10
A	CN 102236003 A, (复旦大学), 09.11 月.2011 (09.11.2011) 参见全文	1-10



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

26.8 月 2013 (26.08.2013)

国际检索报告邮寄日期

12.9 月 2013 (12.09.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

张彬

电话号码: (86-10) **61648321**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/076942

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 102236003 A	09.11.2011	无	

续第 2 页: **A.** 主题的分类

C12M 1/00 (2006.01) i

C07K 1/04 (2006.01) i

C12P 21/06 (2006.01) i