



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106353295 A

(43)申请公布日 2017.01.25

(21)申请号 201611041514.7

(22)申请日 2016.11.11

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 杨真威 欧先金 李雪梅 陈媛媛

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 刘美丽

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

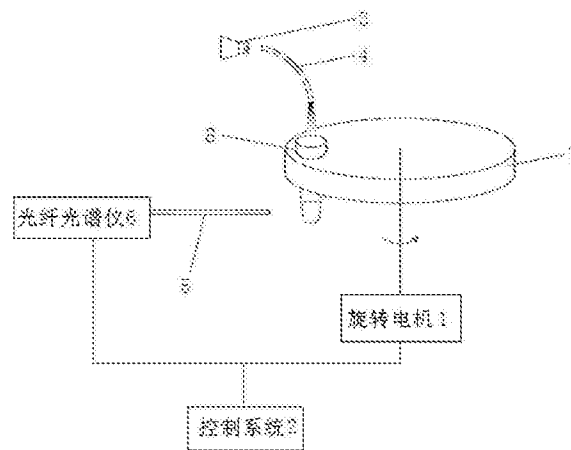
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种蛋白质热稳定分析仪

(57)摘要

本发明涉及一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于包括样品仓、旋转电机、控制系统和光学检测系统;样品仓为封闭隔热式腔体,样品仓内设置有可旋转样品盘,可旋转样品盘顶部周向间隔设置若干用于放置蛋白质样品的样品容器,旋转电机输出端穿过样品仓固定连接可旋转样品盘,控制系统电连接旋转电机和样品仓;光学检测系统包括双波长激发光光源和光纤光谱仪,双波长激发光光源将某一波长激发光发射到蛋白质样品上方,经激发光激发蛋白质样品产生的荧光发射到光纤光谱仪,光纤光谱仪将检测到的荧光信号转换为荧光强度数据并发送到所述控制系统,控制系统进行数据处理完成蛋白质样品的热稳定性分析,本发明可以广泛应用于检测蛋白质热稳定性实验中。



1. 一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于,该分析仪包括样品仓、旋转电机、控制系统和光学检测系统;

所述样品仓为封闭隔热式腔体,所述样品仓内设置有一可旋转样品盘,所述可旋转样品盘顶部周向间隔设置若干用于放置蛋白质样品的样品容器,所述旋转电机输出端穿过所述样品仓固定连接所述可旋转样品盘,所述控制系统电连接所述旋转电机和样品仓;

所述光学检测系统包括双波长激发光源和光纤光谱仪,所述双波长激发光源将某一波长激发光进入所述样品仓发射到所述蛋白质样品上方,经激发光激发所述蛋白质样品产生的荧光发射到位于所述样品仓外部的光纤光谱仪,所述光纤光谱仪将检测到的荧光信号转换为荧光强度数据并发送到所述控制系统,所述控制系统进行数据处理完成所述蛋白质样品的热稳定性分析。

2. 如权利要求1所述的一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于,所述样品仓的封闭隔热式腔体采用半导体材料,所述控制系统对所述样品仓内的温度控制范围为 $10^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ ,温控精度为 $0.1^{\circ}\text{C}$ ,升降温速率为 $1^{\circ}\text{C}\sim 3^{\circ}\text{C}$ 每分钟。

3. 如权利要求1所述的一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于,所述控制系统采用计算机,所述计算机内设置有电机控制单元、温度控制单元和数据处理单元,所述电机控制单元用于控制所述旋转电机进而控制所述可旋转样品盘的转动;所述温度控制单元用于控制所述样品仓内的温度进而控制所述蛋白质样品的温度;所述数据处理单元用于将接收到的荧光强度数据与所述蛋白质样品温度数据进行处理得到所述蛋白质样品荧光强度与温度的关系。

4. 如权利要求1所述的一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于,所述双波长激发光源发出的某一波长激发光经激发光光纤导入所述样品仓内。

5. 如权利要求1所述的一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于,所述蛋白质样品经激发光激发产生的荧光经发射光光纤导出所述样品仓被所述光纤光谱仪接收。

6. 如权利要求1所述的一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于,所述双波长激发光源的波长采用365nm和470nm,两个不同波长的激发光光源通过手动进行切换实现膜蛋白质和可溶性蛋白质的热稳定性分析。

7. 如权利要求1所述的一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于,所述光纤光谱仪的检测范围为200nm~760nm连续可调。

8. 如权利要求1所述的一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于,所述样品容器采用样品管。

## 一种蛋白质热稳定分析仪

### 技术领域

[0001] 本发明是关于一种利用蛋白质热熔解方法广泛分析膜蛋白质和可溶性蛋白质的蛋白质热稳定分析仪。

### 背景技术

[0002] 蛋白质是组成人体细胞、组织的重要成分,其多种多样的功能与各种蛋白质特定的空间构象密切相关,蛋白质的空间构象是其功能活性的基础,然而蛋白质在某些物理或化学因素作用下其特定的空间构象会被改变,从而导致其理化性质改变和生物活性丧失,蛋白质的稳定性除由自身的空间构象,如氨基酸组成、氢键、二硫键,疏水键决定之外,还取决于蛋白质储存或反应缓冲液中的pH值、盐浓度及各种辅助因子的条件,无论是在工业生产酶的使用还是在医药领域蛋白质药物的应用上,人们都希望蛋白质具有好的稳定性使其使用效率提高,且便于储存和运输,因此,蛋白质的稳定性筛选历来是蛋白质研究的一项重要内容。

[0003] 科学家们使用多种方法研究蛋白质的稳定性,包括生物传感器、量热仪和圆二色谱等,但是这些方法具有价格昂贵或低通量性等缺点,而近年来应用日益广泛的蛋白质热熔解方法能以高通量的形式,借助某些染料快速廉价地筛选出稳定的蛋白质样品,迅速缩小研究范围,为后续更多实验提供基础。

[0004] 蛋白质热熔解方法是将蛋白质与相应的染料混合,在连续的升温过程中蛋白质的空间构象会遭到破坏,染料与特定基团结合而产生荧光信号,实时采集此荧光信号,最终形成目的蛋白质在某一条件下特异的温度—荧光曲线,蛋白质的结构、溶液的pH值、盐浓度或缓冲液组分的变化反映为此荧光图像以及由此计算出的 $T_m$ 值(熔解温度)的相对变化,荧光图像和 $T_m$ 值的差异可以反映出蛋白质的稳定性, $T_m$ 值越高,蛋白质的稳定性越好,因此,根据不同突变蛋白质在相同条件下的荧光图像和 $T_m$ 值的相应变化,可以分析突变对蛋白质热稳定性的影响,根据相同蛋白质样品在不同条件下的荧光图像和 $T_m$ 值的相应变化,可以分析溶液条件或配体对蛋白质热稳定性的影响。

[0005] 目前,蛋白质热熔解实验都是借助实时荧光定量PCR仪可以连续升温、实时荧光检测的特点在实时荧光定量PCR仪上进行的,实时荧光定量PCR仪做蛋白质热熔解实验具有通量高、反应迅速的优势,但是最大的局限在于这类仪器的荧光检测范围不足以完全满足蛋白质熔解实验的需要,例如,对于可溶性蛋白质,主要是利用syproorange染料在绿光通道(激发光为470nm左右,荧光为510~530nm,不同型号仪器略有差异)分析,可实际上,syproorange最合适的波长是激发光470nm和荧光570nm,绿光通道的发射光与最适波长有较大偏差;再例如,市面上无论是进口还是国产的荧光定量PCR产品的荧光检测范围多是510nm绿光以上波长,而膜蛋白质染料CPM(激发光384nm,发射光470nm)的合适波长在蓝光通道(激发光为365nm,荧光为460nm),即膜蛋白质实验在普通荧光定量PCR仪上完全无法进行。

### 发明内容

[0006] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种荧光检测范围广,能够同时完成膜蛋白质和可溶性蛋白质的热稳定性分析的蛋白质热稳定分析仪。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取以下方法方案:一种蛋白质热稳定分析仪,其特征在于,该分析仪包括样品仓、旋转电机、控制系统和光学检测系统;所述样品仓为封闭隔热式腔体,所述样品仓内设置有一可旋转样品盘,所述可旋转样品盘顶部周向间隔设置若干用于放置蛋白质样品的样品容器,所述旋转电机输出端穿过所述样品仓固定连接所述可旋转样品盘,所述控制系统电连接所述旋转电机和样品仓;所述光学检测系统包括双波长激发光源和光纤光谱仪,所述双波长激发光源将某一波长激发光进入所述样品仓发射到所述蛋白质样品上方,经激发光激发所述蛋白质样品产生的荧光发射到位于所述样品仓外部的光纤光谱仪,所述光纤光谱仪将检测到的荧光信号转换为荧光强度数据并发送到所述控制系统,所述控制系统进行数据处理完成所述蛋白质样品的热稳定性分析。

[0008] 优选地,所述样品仓的封闭隔热式腔体采用半导体材料,所述控制系统对所述样品仓内的温度控制范围为 $10^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ ,温控精度为 $0.1^{\circ}\text{C}$ ,升降温速率为 $1^{\circ}\text{C}\sim 3^{\circ}\text{C}$ 每分钟。

[0009] 优选地,所述控制系统采用计算机,所述计算机内设置有电机控制单元、温度控制单元和数据处理单元,所述电机控制单元用于控制所述旋转电机进而控制所述可旋转样品盘的转动;所述温度控制单元用于控制所述样品仓内的温度进而控制所述蛋白质样品的温度;所述数据处理单元用于将接收到的荧光强度数据与所述蛋白质样品温度数据进行处理得到所述蛋白质样品荧光强度与温度的关系。

[0010] 优选地,所述双波长激发光源发出的某一波长激发光经激发光光纤导入所述样品仓内。

[0011] 优选地,所述蛋白质样品经激发光激发产生的荧光经发射光光纤导出所述样品仓被所述光纤光谱仪接收。

[0012] 优选地,所述双波长激发光源的波长采用 $365\text{nm}$ 和 $470\text{nm}$ ,两个不同波长的激发光源通过手动进行切换实现膜蛋白质和可溶性蛋白质的热稳定性分析。

[0013] 优选地,所述光纤光谱仪的检测范围为 $200\text{nm}\sim 760\text{nm}$ 连续可调。

[0014] 优选地,所述样品容器采用样品管。

[0015] 本发明由于采取以上方法方案,其具有以下优点:1、本发明的蛋白质热稳定分析仪,与实时荧光定量PCR仪相比,采用可切换 $365\text{nm}$ 和 $470\text{nm}$ 波长的双波长激发光源, $200\sim 760\text{nm}$ 任意波长检测的光纤光谱仪,因此能够实现利用热熔解方法广泛分析膜蛋白质和可溶性蛋白质的热稳定性。2、本发明通过控制系统控制样品仓的温度范围为 $10\sim 100^{\circ}\text{C}$ ,能完全满足蛋白熔解实验所需要的温度环境。3、本发明采用高通量且可以通过改变可旋转样品盘的规格提高通量的设计,在一至两小时内可以获得批量样品结果。3、本发明的光学检测系统采用后分光的光纤光谱仪,可以避免激发光源对发射光信号造成的干扰。综上,本发明结构简单,可以广泛用于检测膜蛋白质和可溶性蛋白质的热稳定性中。

## 附图说明

[0016] 图1是本发明的蛋白质热稳定分析仪的结构示意图。

## 具体实施方式

[0017] 以下结合附图来对本发明进行详细的描绘。然而应当理解,附图的提供仅为了更好地理解本发明,它们不应该理解成对本发明的限制。

[0018] 如图1所示,本发明的蛋白质热稳定分析仪包括样品仓(图中未示出)、旋转电机1、控制系统2和光学检测系统,光学检测系统包括激发光光源3、激发光光纤4、发射光光纤5和光纤光谱仪6,且激发光光源3为波长可切换的双波长激发光光源3;

[0019] 样品仓为一具有精确控温功能的封闭隔热式腔体,样品仓内设置有一可旋转样品盘7,可旋转样品盘7顶部周向间隔设置若干用于放置蛋白质样品的样品容器8,旋转电机1的输出端穿过样品仓固定连接可旋转样品盘7底部中心,控制系统2分别电连接旋转电机1和样品仓,控制系统2通过旋转电机1控制可旋转样品盘7转动,且控制系统2通过控制样品仓内温度进而控制蛋白质样品温度;

[0020] 双波长激发光光源3将某一波长激发光通过激发光光纤4经样品仓发射到蛋白质样品的上方,样品仓升温过程中蛋白质样品去折叠而与染料结合,经激发光激发蛋白质样品产生的荧光发射到位于样品仓外部的光纤光谱仪6,光纤光谱仪6将检测到的荧光信号转换为荧光强度数据并发送到控制系统2,控制系统2进行数据处理完成蛋白质样品的热稳定性分析。

[0021] 在一个优选的实施例中,样品仓的封闭隔热式腔体可以采用半导体材料,且控制系统2对样品仓内的温度控制范围为 $10^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ ,温控精度为 $0.1^{\circ}\text{C}$ ,升降温速率为 $1^{\circ}\text{C}\sim 3^{\circ}\text{C}$ 每分钟。

[0022] 在一个优选的实施例中,样品仓底部设置有一用于穿设旋转电机1的第一通孔,第一通孔上方固定设置一用于固定连接可旋转样品盘7的轴承座,样品仓外壁设置用于穿设激发光光纤4和发射光光纤5的通孔。

[0023] 在一个优选的实施例中,样品容器8可以采用样品管。

[0024] 在一个优选的实施例中,控制系统2可以采用计算机,计算机内设置有电机控制单元21、温度控制单元22和数据处理单元23,电机控制单元21用于通过旋转电机1控制可旋转样品盘7转动;温度控制单元22用于控制样品仓内的温度进而控制蛋白质样品温度;数据处理单元23用于将接收到的荧光强度数据与蛋白质样品温度数据进行处理得到蛋白质样品荧光强度与温度的关系。

[0025] 在一个优选的实施例中,双波长激发光光源3的波长可以采用365nm和470nm,两个不同波长的激发光光源3可以手动进行切换实现膜蛋白质和可溶性蛋白质的热稳定性分析。

[0026] 在一个优选的实施例中,光纤光谱仪6的检测范围为200nm~760nm连续可调。

[0027] 下面通过具体实施例详细说明本发明的蛋白质热稳定分析仪对蛋白质样品的检测过程:

[0028] 实验中可通过sypro orange染料(激发光为470nm、荧光为570nm)分析可溶性蛋白质的热稳定性,通过CPM染料(激发光为为384nm、荧光为470nm)分析膜蛋白质的热稳定性,本实施例以可溶性蛋白质进行详细说明:

[0029] 1)将加入sypro orange染料的可溶性蛋白质样品的若干待测样品管分别放入可旋转样品盘7上,并将双波长激发光光源3切换为470nm波长,打开激发光光源3使激发光通过激发光光纤4发射至样品管8上方;

[0030] 2)调节光纤光谱仪6使光纤光谱仪6只检测波长为570nm的荧光信号,通过温度控制单元22控制样品仓内的温度及升温速率,通过电机控制单元21控制可旋转样品盘7转速,使样品管8逐一处于激发光光纤4的出光端,激发光光源3通过激发光光纤4发射到可溶性蛋白质样品中,sypro orange染料经激发光激发产生波长为570nm的荧光经发射光光纤5发射到光纤光谱仪6;

[0031] 3)光纤光谱仪6将接受到的570nm的荧光信号转换为荧光强度数据并发送到控制系统2中,数据处理单元23将得到的可溶性蛋白质样品荧光强度数据和温度数据进行拟合得到可溶性蛋白质样品升温过程中每一可溶性蛋白质样品所对应的温度—荧光强度曲线;

[0032] 3)根据可溶性蛋白质样品的温度—荧光强度曲线中荧光信号迅速变强时对应的温度得到该条件下相应可溶性蛋白质样品的 $T_m$ 值,进而可以分析可溶性蛋白质的热稳定性。

[0033] 上述各实施例仅用于说明本发明,其中各部件的结构、连接方式和制作工艺等都是可以有所变化的,凡是在本发明方法方案的基础上进行的等同变换和改进,均不应排除在本发明的保护范围之外。

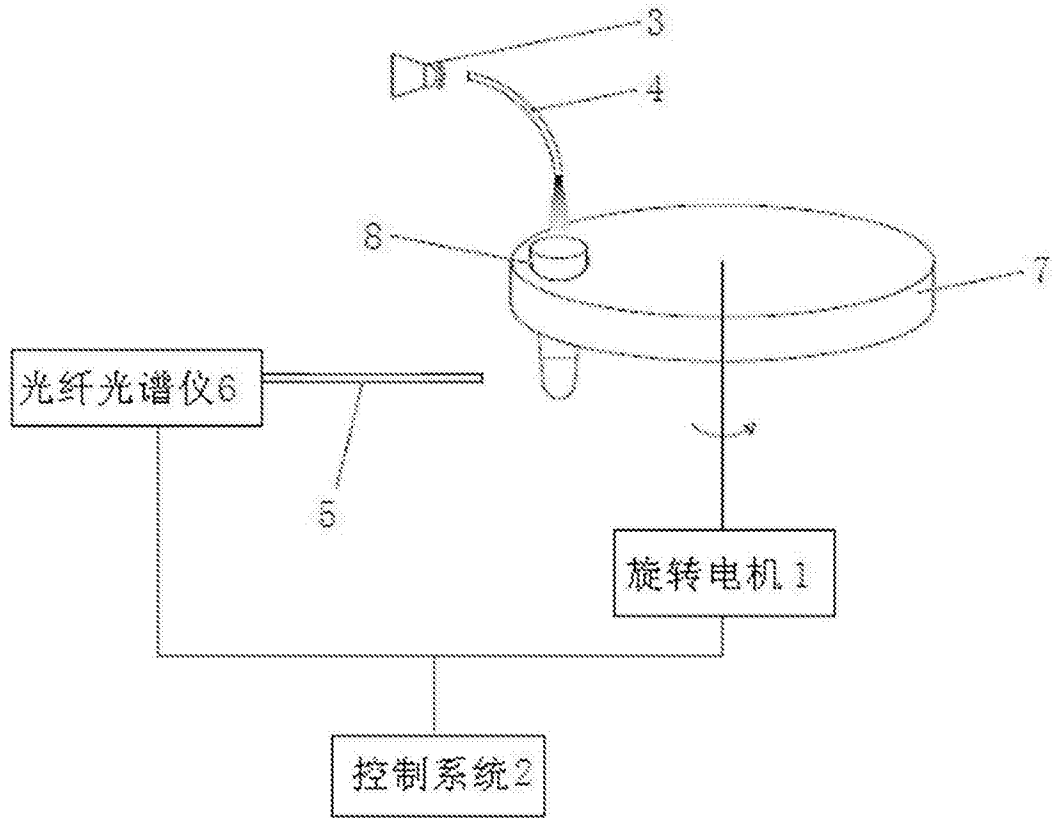


图1