



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111574584 A

(43)申请公布日 2020.08.25

(21)申请号 202010434072.2

(22)申请日 2020.05.21

(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 欧先金 李雪梅

(74)专利代理机构 北京植德律师事务所 11780  
代理人 唐华东

(51)Int.Cl.  
C07K 1/16(2006.01)  
C07K 1/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

全自动蛋白质纯化系统装置及其用途

(57)摘要

本发明公开了一种全自动蛋白质纯化系统装置,其包括层析装置(0)、第一驱动装置、连接管路(2)、定位装置(3)、第二驱动装置、第一容器(5)、第二容器(6)、第一阀门、第二阀门及其控制装置。所述全自动蛋白质纯化系统装置能够完全自动化地完成蛋白质层析纯化操作,设备结构简单,成本低廉,对样品液品质要求低,不会出现管路堵塞等问题,适用性广,可大大提高生物领域蛋白质层析纯化的自动化和降低人工投入。

1. 一种全自动蛋白质纯化系统装置,其包括层析装置(0)、第一驱动装置、连接管路(2)、定位装置(3)、第二驱动装置、第一容器(5)、第二容器(6)、第一阀门、第二阀门及其控制装置,连接管路(2)一端连接于层析装置(0),另一端连接于定位装置(3)上,第二驱动装置驱动定位装置(3),第一容器(5)通过第一两通阀经由管路与层析装置(0)上部连接,第二容器(6)通过第二两通阀经由管路与层析装置(0)上部连接,其特征在于,所述第一驱动装置驱动第一容器(5)中的溶液流经层析装置(0),流穿的液体通过连接管路(2)而被收集到定位在该连接管路(2)下方的第二容器(6)中;连接管路(2)随着定位装置(3)一起转动,从而使连接管路(2)的出口定位在第二容器(6)的上方;

优选地,所述第一驱动装置是蠕动泵(1);

优选地,所述第二驱动装置是电机(4);

优选地,所述第一阀门是第一两通阀(51);

优选地,所述第二阀门是第二两通阀(61)。

2. 根据权利要求1所述的全自动蛋白质纯化系统装置,其中,所述层析装置(0)包含液位探测器(11)。

3. 根据权利要求1或2所述的全自动蛋白质纯化系统装置,其中,所述层析装置(0)是层析柱。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的全自动蛋白质纯化系统装置,其中,所述连接管路(2)是软管,更优选地是硅胶软管。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的全自动蛋白质纯化系统装置,其中,所述定位装置(3)是定位柱,更优选地,所述定位装置可以360度转动。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的全自动蛋白质纯化系统装置,其中,所述第二驱动装置是步进电机。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的全自动蛋白质纯化系统装置,其中,所述自动蛋白质纯化系统装置至少包含所述第一容器(5)和所述第二容器(6);优选地,所述全自动蛋白质纯化系统装置还包含其它4个容器。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的全自动蛋白质纯化系统装置,其中,所述全自动蛋白质纯化系统装置还包括:第三容器(7)、第四容器(8)、第五容器(9)、第六容器(10)、第三阀门、第四阀门、第五阀门和第六阀门,所述第三容器(7)、第四容器(8)、第五容器(9)、第六容器(10)分别通过第三阀门、第四阀门、第五阀门和第六阀门经由管路与层析装置(0)上部连接;

优选地,所述第三阀门是第三两通阀(71);

优选地,所述第四阀门是第四两通阀(81);

优选地,所述第五阀门是第五两通阀(91);

优选地,所述第六阀门是第六两通阀(101);

优选地,所述两通阀是两通电磁阀。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的全自动蛋白质纯化系统装置,其中,所有阀门都是常闭阀门,只有上电后才变为开启状态;优选地,任一时刻只有一个阀门是开通的,其他都处于关闭状态。

10. 根据权利要求1-9任一项所述的全自动蛋白质纯化系统装置在纯化蛋白质中的用途。

## 全自动蛋白质纯化系统装置及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学工程和生物学领域,尤其涉及全自动蛋白质纯化系统装置及其用于蛋白质的亲和层析等分离纯化的用途。

### 背景技术

[0002] 蛋白质是科学研究领域的重要研究对象和材料,也是我们社会生活中的重要工业产品,比如治疗糖尿病的胰岛素。不管是科学研究还是工业生产,蛋白质分离纯化是必不可少的操作。在基因工程技术很成熟的今天,蛋白质制备通常是重组基因工程手段构建重组细胞,然后人为控制蛋白质的强化表达。重组表达细胞构建操作过程中,在目标蛋白质序列的上游或下游添加某个能够被特异性、可逆吸附的多肽/蛋白质序列,这能够大大方便目标蛋白质的富集纯化,这种被特定介质可逆结合的多肽序列通常叫做标签,这种蛋白质纯化方式叫做亲和层析,这是生物学领域最常见的操作之一。比较常见的亲和层析纯化标签是连续6个组氨酸的序列,标记为His\*6。具体的亲和层析操作如下,首先,含有His\*6标签的目标蛋白质溶液借助其重力驱动流经螯合镍离子基质,重复2-3次,让目标蛋白质与介质充分结合。其次,目标蛋白质被特异性吸附之后,用含有低浓度咪唑(通常是10-20mM)的缓冲溶液清洗杂蛋白质。最后用含有高浓度咪唑的缓冲液洗脱螯合镍离子基质,得到纯度较高的目标蛋白质,通常能够达到80%以上。

[0003] 目前主流的蛋白质亲和层析操作方式都是人工,其缺点如下:1) 整个过程持续几个小时到几十个小时,费时费力。2) 每次蛋白质样品液的粘度、浓度等性质不同使每次流经基质的速度偏差很大,导致蛋白质的亲和结合效果不一。

[0004] 发明名称为“一种适宜重力柱的蛋白质纯化自动装置”、申请号为CN201711448428.2的中国发明专利申请开发了一种自动化蛋白质纯化装置,其依靠样品液的重力作为驱动力。其不足之处是仅仅适用重力层析柱类型,如果样品液的浓度或粘度过高,会导致液体流速过慢或者堵塞,影响操作效果。另外,该装置属于半自动装置,不能实现蛋白质的挂柱吸附、洗杂蛋白质和洗脱目标蛋白质的完全自动化操作。

[0005] GE医疗公司的蛋白质纯化系统AKTA可自动化完成蛋白质的吸附、洗杂和洗脱操作。该类设备通常由高端精密的流体泵来提供动力,进样电磁阀和多位选择电磁阀来完成液体流向操作和多波长紫外检测器来确定操作状态和动作切换。其缺点有以下两点:第一,设备非常昂贵,非自动化的常规纯化型号设备通常价格在40-50万人民币,能够实现全自动蛋白质纯化操作型号的价格会更高。第二点,流体泵、进样阀、旋转阀等关键零部件都属于精密仪器,对样品液品质要求很高,否则容易堵塞或者漏液。

### 发明内容

[0006] 为了解决现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种包括步进电机、两通阀、蠕动泵及其控制系统的全自动蛋白质纯化系统装置,其能够完全自动化地完成蛋白质层析纯化操作,设备结构简单,成本低廉,对样品液品质要求低,不会出现管路堵塞等问题,适用性

广,可大大提高生物领域蛋白质层析纯化的自动化和降低人工投入。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了一种全自动蛋白质纯化系统装置,其包括层析装置0、第一驱动装置、连接管路2、定位装置3、第二驱动装置、第一容器5、第二容器6、第一阀门、第二阀门及其控制装置,连接管路2一端连接于层析装置0,另一端连接于定位装置3上,第二驱动装置驱动定位装置3,第一容器5通过第一两通阀经由管路与层析装置0上部连接,第二容器6通过第二两通阀经由管路与层析装置0上部连接,其特征在于,所述第一驱动装置驱动第一容器5中的溶液流经层析装置0,流穿的液体通过连接管路2而被收集到定位在该连接管路2下方的第二容器6中;连接管路2随着定位装置3一起转动,从而使连接管路2的出口定位在第二容器6的上方;

[0008] 在本发明的一个方案中,所述第一驱动装置是蠕动泵1;

[0009] 在本发明的一个方案中,所述第二驱动装置是电机4;

[0010] 在本发明的一个方案中,所述第一阀门是第一两通阀51;

[0011] 在本发明的一个方案中,所述第二阀门是第二两通阀61。

[0012] 在本发明的一个方案中,所述层析装置0包含液位探测器11。

[0013] 在本发明的一个方案中,所述层析装置0是层析柱。

[0014] 在本发明的一个方案中,所述连接管路2是软管,更优选地是硅胶软管。

[0015] 在本发明的一个方案中,所述定位装置3是定位柱,更优选地,所述定位装置可以360度转动。

[0016] 在本发明的一个方案中,所述电机4是步进电机。

[0017] 在本发明的一个方案中,所述自动蛋白质纯化系统装置至少包含所述第一容器5和所述第二容器6;优选地,所述全自动蛋白质纯化系统装置还包含其它4个容器,即所述自动蛋白质纯化系统装置包含容器的数目为6个。

[0018] 在本发明的一个方案中,所述全自动蛋白质纯化系统装置还包括:第三容器7、第四容器8、第五容器9、第六容器10、第三阀门、第四阀门、第五阀门和第六阀门,所述第三容器7、第四容器8、第五容器9、第六容器10分别通过第三阀门、第四阀门、第五阀门和第六阀门经由管路与层析装置0上部连接;

[0019] 优选地,所述第三阀门是第三两通阀71;

[0020] 优选地,所述第四阀门是第四两通阀81;

[0021] 优选地,所述第五阀门是第五两通阀91;

[0022] 优选地,所述第六阀门是第六两通阀101;

[0023] 优选地,所述两通阀是两通电磁阀。

[0024] 在本发明的一个方案中,所有阀门都是常闭两通阀,只有上电后才变为开启状态;优选地,任一时刻只有一个阀门是开通的,其他都处在关闭状态。

[0025] 在本发明的一个方案中,所述全自动蛋白质纯化系统装置用于纯化蛋白质,可以全自动化完成蛋白质的吸附、洗涤和洗脱。

[0026] 在本发明的一个方案中,使用时根据用户的具体需求再增加对应的层析柱。

[0027] 本发明的有益效果包括:

[0028] (1) 本发明设备能够对蛋白质样品实现完全自动化的层析纯化操作。

[0029] (2) 本发明采用2个或2个以上的容器,装样品液和清洗液,不同样品液之间的选择

通过阀门(例如电磁阀)等on/off之类流体控制阀即可简单实现。

[0030] (3) 经过层析柱之后的液体去向的选择仅由1个驱动装置(例如步进电机)转动即可简单实现。

[0031] (4) 液位探测及其延迟时间的设计,方便指示在不同液体中切换操作,确保层析介质不流干。

[0032] (5) 液体驱动力由蠕动泵驱动,简单可靠,且对样品液品质要求低,增加设备的适用范围。

## 附图说明

[0033] 图1为本发明的全自动蛋白质纯化系统装置。

图2示出本发明全自动蛋白质纯化系统装置,硅胶软管2定位在第二容器6的正上方。

[0034] 附图标记说明:

[0035] 0、层析柱;1、蠕动泵;2、硅胶软管;3、定位柱;4、步进电机;5、第一容器;6、第二容器;7、第三容器;8、第四容器;9、第五容器;10、第六容器;51、第一两通电磁阀;61、第二两通电磁阀;71、第三两通电磁阀;81、第四两通电磁阀;91、第五两通电磁阀;101、第六两通电磁阀;11、液位探测器

## 具体实施方式

[0036] 以下结合具体实施例,进一步阐明本发明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,应理解这些实施例仅用于说明本发明而不限制本发明的范围。

[0037] 实施例1全自动蛋白质纯化系统装置

[0038] 图1显示了全自动蛋白质纯化系统装置。所述全自动蛋白质纯化系统装置包括层析柱0、蠕动泵1、硅胶软管2、定位柱3、步进电机4、第一容器5、第二容器6、第三容器7、第四容器8、第五容器9、第六容器10、第一两通电磁阀51、第二两通电磁阀61、第三两通电磁阀71、第四两通电磁阀81、第五两通电磁阀91、第六两通电磁阀101、液位探测器11及其电路板控制系统,其中,步进电机4驱动与之相连的定位柱3,使定位柱可以360度转动;硅胶软管2的一端连接层析柱0的出口,中间卡在蠕动泵上,另外一端固定在定位柱的横杆上。根据设定指令,硅胶软管2随着定位柱3一起转动,从而使硅胶软管2的出口可以定位在第一容器5、第二容器6、第三容器7、第四容器8、第五容器9或第六容器10中的任一容器的上方(图1示出定位在第三容器7的上方)。

[0039] 层析柱0分为上部和下部,其中,层析柱0的上部通过管路与容器连通,层析柱0的下部(网格部分)填充有亲和介质。第一容器5、第二容器6、第三容器7、第四容器8、第五容器9和第六容器10底部均有出口连接管路,该连接管路分别相应地先与第一两通电磁阀51、第二两通电磁阀61、第三两通电磁阀71、第四两通电磁阀81、第五两通电磁阀91或第六两通电磁阀101连接,之后再通过管路连接到层析柱0的上部接口。所有电磁阀都是常闭电磁阀,只有上电后才变为开启状态。根据操作程序的预设指令,任一时刻只有一个电磁阀是开通的,其他都处在关闭状态。层析柱0下部出口与硅胶软管2连接,硅胶软管由蠕动泵1控制并提供动力。根据预设指令进行运转,第一容器5、第二容器6、第三容器7、第四容器8、第五容器9和第六容器10中某个电磁阀开启,蠕动泵驱动与之对应的容器中的溶液流经层析柱0,

流穿的液体通过硅胶软管2而被收集到定位在该硅胶软管2正下方的某个容器中。

[0040] 在层析柱0内部的上方的一定高度位置处设置一个液位探测器11,用于利用溶液的导电性来提醒液体液位情况。液体正常流动时,液位探测器上面的A/B金属探头(图1中11下部“+”,“-”所示)都浸没在样品液中,由于液体的导电性,探测器会给出高电平信号,表示当前溶液正常流动。当样品即将流干了,层析中的液位慢慢下降,某时刻促使探测器裸露在液面之上,探头上2个电极断开连接,会给系统一个低电平信号,表明当前液体即将流干,提醒程序即将可以进入下一阶段。

[0041] 实施例2控制参数设计

[0042] 本发明设备主要可设定的运行参数有3个:挂柱次数N、延迟时间T秒和液体流速。N代表样品液流经层析柱的次数,实际上就是样品与介质的吸附次数,在人工进行蛋白质层析纯化时,通常挂柱吸附2次就足够了,故可以直接设定N等于2。延迟时间T秒是指在设备运转时,液位探测器的A/B金属探头上的电极刚露出液面时,系统会收到从高电平切换到低电平的信号,实际还需要T秒之后,图1中层析柱0内部的液面才能降低到吸附介质的上端位置(表明样品被消耗完),此时再进入下一步操作,比如切换电磁阀。时间T的设置需要根据设备的具体参数来设定,具体与液体流速、层析柱的内径和液位探测器高/低位置相关。延迟时间T设定值,通过实测实验结果来确定。液体流速以每分钟多少毫升流量来表示,与蠕动泵的转速和对应软管2尺寸相关,具体看使用者需求来设定,也是通过实测实验结果来确定。

[0043] 实施例3蛋白质亲和吸附

[0044] 带His\*6亲和纯化标签蛋白质的大肠杆菌细胞超声波破碎后,经过16000g离心力高速离心30分钟得到的上清液,得50毫升体积的上清液,将该上清液放置在图2中的第一容器5中。挂柱次数N设定为2,流速设定为1.5毫升/分钟,延迟时间T等于30秒。装有镍介质的层析柱提前用50mM Tris蛋白质缓冲液(pH=8)平衡好。选择“吸附”模式并启动自动程序后,第一容器5连接的第一两通电磁阀51上电后连通管路,硅胶软管2定位在第二容器6的正上方。蠕动泵启动,驱动第一容器5的新鲜蛋白质液体源源不断通过电磁阀51之后,流经含有亲和介质的层析柱0,吸附后的流穿液体通过硅胶软管2被收集到第二容器6中。整个吸附过程中液位探测器11一直处在高电平状态。约29分钟时,样品液将要消耗完,液位探测器切换到低电平,再延迟30秒后,系统关闭第一两通电磁阀51并同时开启第二两通电磁阀61,然后转动定位柱,使固定在定位柱上的硅胶软管2定位到第一容器5的正上方,用于下一步收集第二次挂柱吸附之后的样品液。之后开始蛋白质样品液的第二次吸附挂柱,第二两通电磁阀61开启后的几秒钟内,液位探测器再次浸没在样品液中,系统变成高电平。大概30分钟后,直到液位探测器再次裸露液面,由高电平转换为低电平,此时蛋白质样品的第二次吸附操作完成,关闭所有电磁阀和蠕动泵。整个过程完全自动化,无需人工干预。

[0045] 实施例4蛋白质亲和吸附、洗杂和洗脱

[0046] 蛋白质样品的挂柱吸附操作与实施例2完全相同(挂柱次数N设定为2,流速设定为1.5毫升/分钟,延迟时间T等于30秒),选定“纯化”模式。挂柱2次后,系统会先用放置在第三容器7中的100毫升洗杂缓冲液(50mM Tris缓冲液,20mM咪唑,pH=8)洗掉非特异性吸附的杂蛋白质,再用放置在第四容器8中的50毫升洗脱缓冲液(50mM Tris缓冲液,300mM咪唑,pH=8)洗脱目标蛋白质,其他设置同实施例1。

[0047] 系统即将完成第二次吸附挂柱时(见实施例2),液位探测器由高电平切换到低电平之后 30秒,系统关闭第二两通电磁阀61,同时开启第三两通电磁阀71,并由步进电机4驱动硅胶软管2,使其定位到第六容器10的正上方,用于收集洗涤层析柱的废液。开始进行洗涤层析柱上面杂蛋白质的自动化操作,第三容器7中的洗杂缓冲液通过第三两电磁阀71之后,流经含有亲和介质的层析柱0,洗涤后的流穿液体通过硅胶软管2被收集到第六容器10中。整个洗涤运行过程中,液位探测器一直浸没在液体中,处于高电平状态。约66分钟后,液位探测器变成低电平之后30秒,系统完成了层析柱的洗涤杂蛋白质操作。

[0048] 系统关闭第三两通电磁阀71,同时开启第四两通电磁阀81,并由步进电机4驱动硅胶软管2,使其定位在第五容器9的正上方,用于收集目标蛋白质。开始持续约30分钟的洗脱目标蛋白质操作,第四容器8中的洗脱缓冲液通过第四两电磁阀81之后,流经含有亲和介质的层析柱0,洗脱后的流穿液体通过硅胶软管2被收集到第五容器9中,得到洗脱的蛋白质样品液。整个洗脱运行过程中,当液位探测器再次由高电平变为低电平之后30秒,系统关闭蠕动泵和所有电磁阀。

[0049] 经过上述步骤,系统全自动化完成了目标蛋白质的吸附、洗涤和洗脱的所有操作。

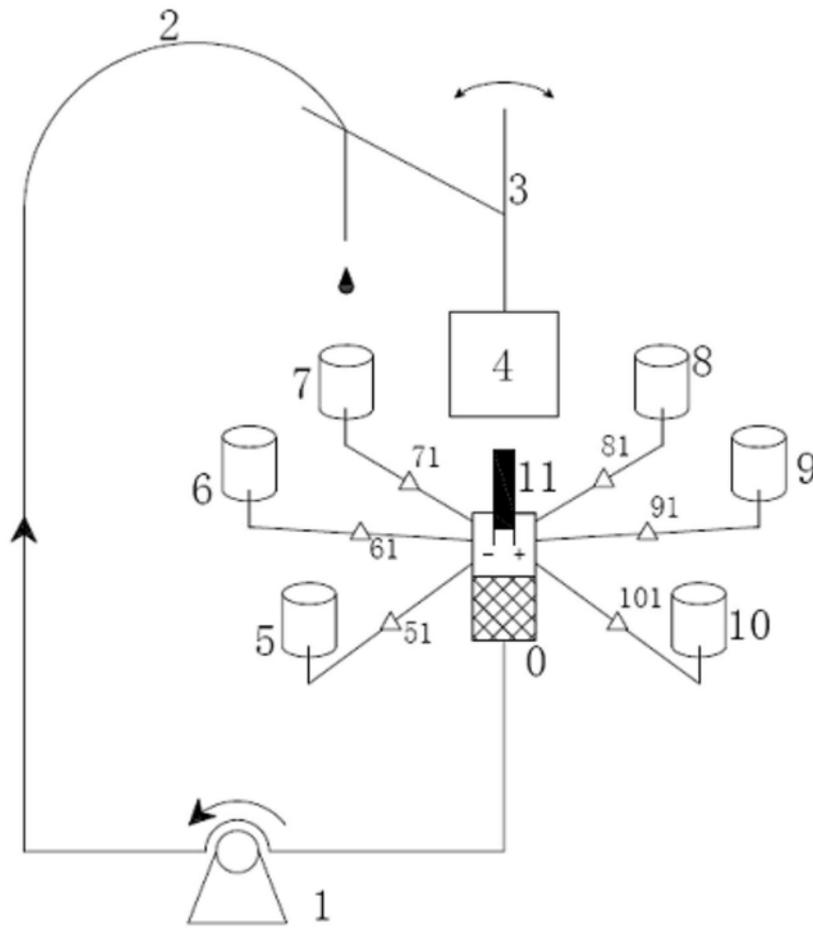


图1

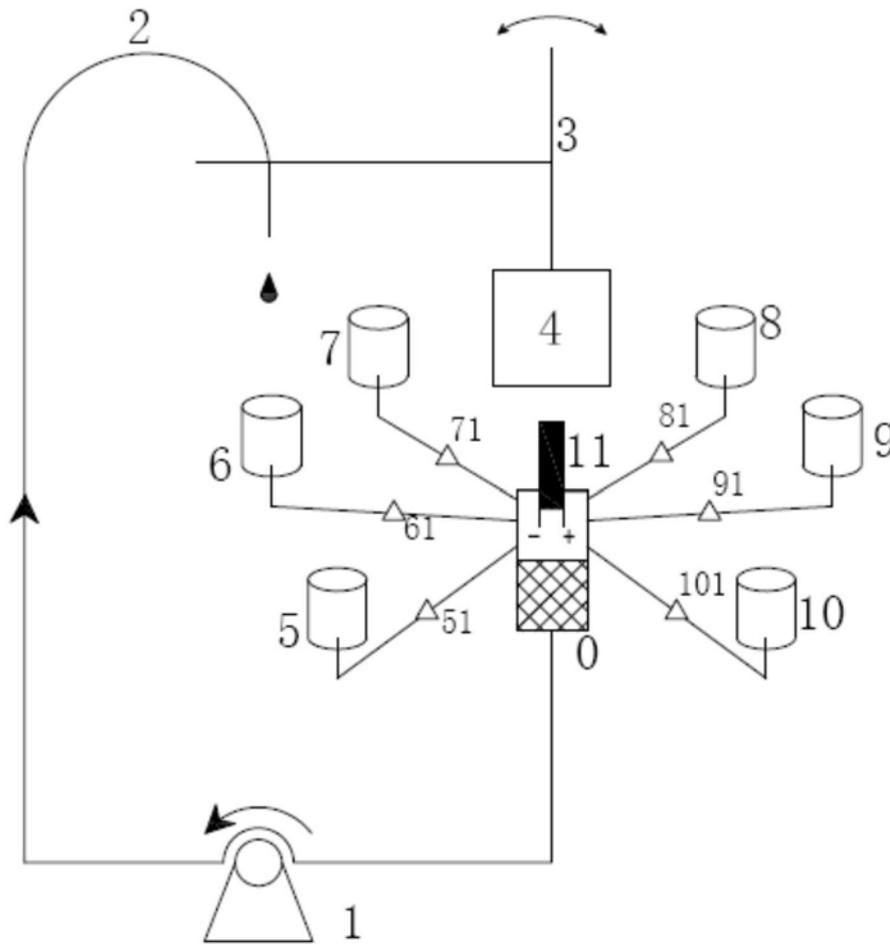


图2