



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110256527 A

(43)申请公布日 2019.09.20

(21)申请号 201910666665.9

(22)申请日 2019.07.23

(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 韩毅 仓怀兴 万纓 李雪梅  
王娅

(74)专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理  
有限公司 11467

代理人 董柏雷

(51) Int. Cl.  
C07K 1/30(2006.01)

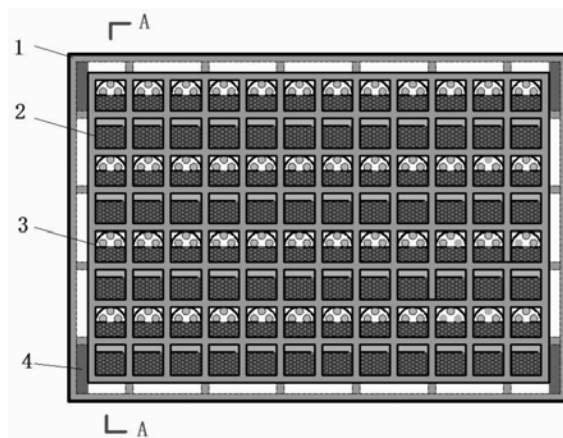
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

一种用于原位X-射线衍射的蛋白质复合育晶盒

(57)摘要

本发明公开了一种用于原位X-射线衍射的蛋白质复合育晶盒,旨在解决生物技术领域需要将蛋白质晶体从结晶室中捞出实施X-射线衍射而可能损伤晶体的技术问题,为研究蛋白质分子的结构与功能和进一步的智能药物开发提供更有效的手段。该复合育晶盒由阵列排布的多个复合结晶室和/或多个汽相结晶室及磁性材料组成,两种结晶室内部都有吸附固定沉淀液或平衡液的多孔质材料、吸附和固定蛋白液和蛋白质晶体的凝胶薄层,以及用于将蛋白液与沉淀液或平衡液隔离开的挡板;挡板上面有缺口或缝隙,使得蛋白液与沉淀液直接接触,或借助汽相接触。接触的结果是蛋白液达到过饱和并析出蛋白质晶体。使用时无需捞出晶体,直接将育晶盒侧立于X-射线衍射仪上即可。



1. 一种用于原位X-射线衍射的蛋白质复合育晶盒,包括由复合结晶室(2)阵列、汽相结晶室(3)阵列以及磁性材料(4)组成的复合育晶盒盒体(1),其特征在于,该育晶盒还包括组成复合结晶室(2)的固液材料(5)、沉淀液(6)、挡板(7)、液相蛋白液(8)、固晶层(9)、液相蛋白晶(10)和承液板(18),以及组成汽相结晶室(3)的吸液材料(11)、平衡液(12)、U型板(13)、吸晶层(14)、汽相蛋白液(15)、汽相蛋白晶(16)和透光底板(17)。

2. 根据权利要求1所述蛋白质复合育晶盒,其特征在于,复合结晶室(2)中的挡板(7)将沉淀液(6)与液相蛋白液(8)分开,但挡板(7)的上侧及其一个侧面留有缝隙,使得固液材料(5)中的沉淀液(6)既可以与液相蛋白液(8)直接接触实现液-液扩散,还可以借助汽相连通实现汽相扩散,实现两种方法同时进行的复合结晶。

3. 根据权利要求1所述蛋白质复合育晶盒,其特征在于,汽相结晶室(3)中的U型板(13)将平衡液(12)与汽相蛋白液(15)隔离开,U型板(13)上的缺口或孔洞可以使得吸液材料(11)中的平衡液(12)与汽相蛋白液(15)借助汽相连通,实现汽相扩散结晶。

4. 根据权利要求1所述蛋白质复合育晶盒,其特征在于,复合育晶盒盒体(1)可以侧立放置在X-射线衍射仪上实施原位衍射,固液材料(5)对沉淀液(6)实施固定以及吸液材料(11)对平衡液(12)的吸附使得这些液体不会流动和与液相蛋白液(8)或汽相蛋白液(15)产生混合而破坏晶体,固晶层(8)对液相蛋白晶(10)及吸晶层(14)对汽相蛋白晶(16)的吸附固定使得复合育晶盒盒体(1)侧立时晶体不动而便于衍射。

5. 根据权利要求1所述蛋白质复合育晶盒,其特征在于,固定在复合育晶盒盒体(1)边角凹槽中的磁性材料(4)可以将复合育晶盒盒体(1)固定在夹具上,无需工具实现装卸。

6. 根据权利要求2所述蛋白质复合育晶盒,其特征在于,承液板(18)位置与复合育晶盒盒体(1)底面平齐,保证X-射线在穿过液相蛋白晶(10)后产生的衍射线不会被复合结晶室(2)的侧壁所阻挡。

7. 根据权利要求3所述蛋白质复合育晶盒,其特征在于,透光底板(17)位置与复合育晶盒盒体(1)底面平齐,保证X-射线在穿过汽相蛋白晶(10)后产生的衍射线不会被汽相结晶室(2)的侧壁所遮挡。

## 一种用于原位X-射线衍射的蛋白质复合育晶盒

### 技术领域

[0001] 本发明公开了一种用于将溶液中生长的蛋白质晶体连同容器一起直接置于X-射线中实施原位衍射的复合育晶盒,属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 生命科学是二十一世纪的科学,人类基因组计划引发的生命科学革命,在后基因组时代的结构基因组或蛋白质组时期达到高潮,因为基因只是生命的蓝图,而蛋白质才是生命的实现。蛋白质既是构筑生命体的“砖块”,又是执行生命活动的“分子机器”。

[0003] 蛋白质分子机器的功能取决于它的分子结构。蛋白质分子非常复杂,通常由成千上万个碳、氢、氧、氮、硫等原子构成。蛋白质的分子结构可以分为I级结构、II级结构、III级结构和IV级结构。I级结构呈无分枝线状,由相同或不同氨基酸的羧基与羟基通过缩合反应生成肽键相连,称为肽链。II级结构是I级结构折叠形成的典型花样,如螺旋状、片层状。蛋白质分子的III级结构是由有序的II级结构和肽链无序部分共同形成的三维空间结构,这时的蛋白质分子便具有了特定的功能。IV级结构是指几条各自具有自己的III级结构的肽链组装形成的复合物,单条肽链称为亚基。可以发现,蛋白质分子的III级结构非常重要,不同的I级结构可以有相似的III级结构以致类似的功能,而不同的III级结构决定了不同的生物学功能。因此,揭示和研究蛋白质分子的III级结构对于进一步研究其生物学功能、病理机制乃至智能蛋白质药物的开发具有十分重要的意义。

[0004] 研究测定蛋白质分子的III级结构是结构基因组学或蛋白质组学的核心工作。当前主要有四种方法:晶体X-射线衍射法、NMR核磁共振法、冷冻透射电子显微镜法、理论预测法。晶体X-射线衍射法是当前最重要和最常用的方法,是将蛋白质分子组装为单晶体,单晶体经过X-射线照射获得包含分子结构信息的衍射花样,衍射花样再经过一系列的晶体学计算分析,最终还原出蛋白质分子三维空间结构的“庐山真面目”。由于蛋白质分子原子多、结构松散、含水量高等一系列原因,生长大尺寸和高质量的晶体非常困难。研究人员为此研制出气相扩散结晶法、液相扩散结晶法、配液结晶法、透析结晶法等各种方法,甚至将结晶工作拿到天上进行,以期借助微重力对蛋白液中对流的抑制来提高蛋白质晶体的生长尺寸和质量。这些方法中,最常用的是气相结晶法和液相结晶法,不同蛋白质有时需要选用不同的方法。

[0005] 随着X-射线光源的功率和质量的提高,如同步辐射光源的使用,对蛋白质晶体尺寸的要求由毫米级降为微米级,但随之而来的问题是晶体的捞取、固定、液氮冷冻、对心调节等操作更加困难。

[0006] 为此,生产桌面级X-射线光源的主要厂家日本Rigaku公司,提出直接将高通量结晶板置于X-射线光路中实施衍射的技术,并研制出结晶板夹持和调位机构,不再使用微米直径的尼龙丝环捞取和冷冻晶体。但是目前市场上并没有为此专用的可侧立放置的高通量结晶板;已公开发明专利“一种蛋白质晶体的原位衍射装置及衍射方法”(公开号CN108593689A)和“近生理状态生物大分子晶体的衍射方法”(公开号CN108732193A)描述了

所发明的原位衍射结晶盒,但双面胶两侧粘贴高分子膜的技术方案在盒子侧立使用时不能固定晶体,而且双面胶对许多蛋白质结晶溶液存在物理化学相容性问题,此外技术方案没有给出蛋白质溶液及其平衡液/沉淀液的布局方案,也就是没有明确采用何种结晶方法,如汽相扩散法、液-液扩散法或者配液法等。普通的结晶板侧立放置时,蛋白质晶体会运动,平衡液和蛋白液会运动,X-射线被晶体衍射后改变方向被结晶室侧壁阻挡,这些问题轻者降低衍射花样的质量,严重时引入错误信息导致解析的蛋白质分子结构不正确。因此,研制可原位衍射的结晶器具成为解决当前问题的关键。

## 发明内容

[0007] 为了解决以上存在的问题和缺陷,本专利发明了一种蛋白质复合育晶盒,育晶盒集成了汽相扩散和液相扩散两种蛋白质结晶方法,适应不同蛋白质需求;同时,育晶盒降低了复合结晶室和汽相结晶室中承托蛋白液的底板,以消除侧壁对衍射后X-射线的阻挡,并在蛋白液和室底之间增加了柔性亲水层用以吸附固定蛋白质晶体;再者,为防止沉淀液或平衡液在育晶盒侧立时流动干扰蛋白液,育晶盒还配备了吸液或固液材料;此外,在育晶盒的边角凹槽中嵌入磁性材料,便于育晶盒在原位衍射夹具上的轻柔装卸。

[0008] 该发明适合用于蛋白质晶体原位X-射线衍射的晶体培育,能够克服阻挡X-射线、沉淀液或平衡液移动、晶体移动等问题。新育晶盒也同样适用于平常无需实施原位X-射线衍射的蛋白质晶体的培育,而且新育晶盒可以防止移动操作不当可能导致的沉淀液或平衡液的移位,柔性亲水层还便于使用微米直径的尼龙丝环捞取蛋白质晶体而不损伤晶体。当前国内外没有类似的产品,新产品的投产使用将免除对微小蛋白质晶体的捞取、液氮冷冻、转移、液氮存储等复杂操作和可能面临的晶体破坏的风险,考虑到前期的蛋白质的制备和试剂耗材的资金成本、时间成本和人力成本,新育晶盒的研制和使用将具有显著的经济效益和社会效益。

[0009] 本发明的创新点在于:

[0010] (1) 借助蛋白液及结晶室底之间的亲水网状材料固定蛋白质晶体;(2) 借助蛋白液及结晶室底之间的亲水网状超分子结构材料或立体网固定蛋白液;(3) 采用开孔式多孔材料或亲水网状超分子结构材料固定沉淀液或平衡液;(4) 降低池底承托蛋白液部分的高度,以消除结晶室侧壁对衍射X-射线的阻挡;(5) 使用磁性材料将育晶盒固定在夹持机构上,装卸方便;(6) 具备汽相结晶和复合结晶两种结晶方法,尤其是复合结晶将传统的汽相结晶和液相结晶有机整合到一起,做到了优势互补。

## 附图说明

[0011] 图1为本发明育晶盒正面投影图;

[0012] 图2为图1中A-A剖面局部结构示意图;

[0013] 图3为复合结晶室立体结构示意图;

[0014] 图4为汽相结晶室立体结构示意图;

[0015] 图5为汽相结晶室溶剂扩散示意图;

[0016] 图6为复合结晶室溶剂扩散示意图;

[0017] 图7为传统结构汽相结晶室阻挡X-射线示意图;

[0018] 图8为新型汽相结晶室消除X-射线阻挡示意图。

### 具体实施方式

[0019] 为了使本领域的技术人员可以更好地理解本发明,下面结合附图和实施例对本发明技术方案进一步说明。

[0020] 1、组成

[0021] 1) 育晶盒整体结构:

[0022] 图1和图2给出了育晶盒的一种优选方案,简要地说,育晶盒由盒体、复合结晶室、汽相结晶室和磁性材料组成,采用左右对称结构布局,由盒体1、复合结晶室2、汽相结晶室3、磁性材料4组成;图2是育晶盒A-A剖面靠近边缘的局部结构示意图。需要说明的是,在该方案中,盒体1与挡板7、U型板13、透光底板17和承液板18是一体式结构,通过注塑工艺一次成型。也可以采取另一种替代方案:复合结晶室2和汽相结晶室3分别是完全独立的小容器,盒体1仅仅是固定复合结晶室2和汽相结晶室3的支架,但此方案的结构性能及成本优势等均不如上面的优选方案,故在此不再赘述。

[0023] 2) 复合结晶室2结构和工作原理:

[0024] 结构:复合结晶室2由固液材料5、沉淀液6、挡板7、液相蛋白液8、固晶层9、液相蛋白晶10和承液板18组成。图3是复合结晶室2的立体结构示意图,其中挡板7的右侧和上侧都没有封闭;液相蛋白液8可以是左右两端宽窄相同,也可以是左宽右窄,以调节液相蛋白液8与沉淀液6之间液-液扩散的温和程度。可选地,挡板7的右侧和上侧也可以封闭,通过在其上开出一些规则或不规则的孔洞形成水分子扩散转移的通道,从而成为单纯的液相扩散,或兼具汽相扩散的复合功能。

[0025] 工作原理:图3所示复合结晶室2立体结构示意图中的挡板7的右侧和上侧都没有封闭,液相蛋白液8与固液材料5中的沉淀液6借助右侧缝隙直接接触,借助上侧的缝隙通过汽相间接接触。如图6所示,该设计使得液相蛋白液8中的水分既可通过与沉淀液6的接触面以液-液扩散的方式转移到沉淀液6,以实现液相蛋白液8的浓缩和过饱和,进而析出液相蛋白晶10;液相蛋白液8中的水分也可蒸发为气体,通过上侧缝隙被沉淀液6吸收,同样实现液相蛋白液8的浓缩和过饱和,最后析出液相蛋白晶10。为防止育晶盒1侧立使用时液相蛋白晶10的移动,在复合结晶室2的承液板18的内表面安装一层亲水材料,即固晶层9,晶体在其表面逐渐长大并慢慢嵌入,实现晶体的固定;固定液相蛋白液8可以采用凝胶,在液体很少时可以不实施固定;固定沉淀液6的是固液材料5。

[0026] 3) 汽相结晶室3的结构和工作原理:

[0027] 结构:汽相结晶室3由吸液材料11、平衡液12、U型板13、吸晶层14、汽相蛋白液15、汽相蛋白晶16和透光底板17组成。图4是汽相结晶室3的立体结构示意图,U型板13上设计出水分子从汽相蛋白液15中蒸发出来被平衡液12吸收的通道;透光底板17的内表面可以点放多个汽相蛋白液15滴;在透光底板17上拟点放汽相蛋白液15滴的位置,贴装吸晶层14。

[0028] 工作原理:图5是汽相结晶室溶剂扩散示意图,可以比较清楚地展示其工作原理,汽相蛋白液15中的溶剂一般是水蒸发成汽体,再通过U型板13上的缺口被暴露的平衡液12所吸收,该过程的持续进行将不断浓缩汽相蛋白液15,并使其达到过饱和,最后在其内部析出汽相蛋白晶16。为避免育晶盒1侧立衍射时汽相蛋白晶16的移位,在汽相结晶室3的透光

底板17的内表面涂装一层亲水材料,也就是吸晶层14,晶体在其表面逐渐长大并慢慢陷入,实现晶体的定位;固定汽相蛋白液15可以采用凝胶或增稠剂,在液体很少时可以不采取措施;固定平衡液12的是吸液材料11。

## [0029] 2、各零部件结构

[0030] 育晶盒箱体1,采用金属或有机材料均可,优选热塑性透明有机材料,材料软化温度不低于70℃。考虑到与现有桌面级X-射线衍射仪的匹配使用,其总体尺寸应控制在以下范围:长度200mm以下,宽度150mm以下,厚度20mm以下。育晶盒箱体1的结构可以如前所述采用整体注塑式结构,箱体1、挡板7、U型板13、透光底板17和承液板18为一体式,注塑表面粗糙度应优于6.3 $\mu\text{m}$ 。次选方案可以是分体模块组合式,挡板7、U型板13、透光底板17和承液板18不与箱体1一体,其中挡板7和承液板18集成在复合结晶室2独立模块中,U型板13和透光底板17则集成在汽相结晶室3独立模块中,箱体1呈具有方孔阵列的框架结构。

[0031] 在一体式结构中,本发明将复合结晶室2的承液板18和汽相结晶室3的透光底板17的位置由传统的半高位置改为与育晶盒箱体1的底面平齐,如图7和图8所示,传统结构遮挡了衍射X-射线,如R2、R3,而新的设计结构则可以有效避免遮挡,从而有效保全了包含蛋白质晶体结构信息的衍射线R2和R3。

[0032] 复合结晶室2是装置的核心之一,在育晶盒箱体1为一体式结构时,复合结晶室2不是与其它部件共同存在的实体部件,它是由育晶盒箱体1的一部分、挡板7、承液板18共同组成,结构如图2、图3和图6所示。复合结晶室2的长、宽和深/高通常均控制在15mm以内,挡板7上沿和侧面的缝隙宽度1-5mm。对于模块化育晶盒结构,复合结晶室2将是一个独立模块,结构如前所述。

[0033] 汽相结晶室3是装置的另一个核心部件,当育晶盒箱体1采用优选的一体式结构时,汽相结晶室3也不是与其它部件一样的实体部件,它是由育晶盒箱体1的一部分、U型板13、透光底板17共同组成,结构如图2、图4和图5所示。汽相结晶室3的长、宽和深/高通常均控制在15mm以内,U型板13将汽相结晶室3的内部空间左右一分为二。对于模块化育晶盒结构,汽相结晶室3也将变为一个独立模块,结构如前所述。

[0034] 磁性材料4,外形为圆柱体或长方体,优选钕铁硼永磁材料,圆柱体时直径3-5mm及长度5-10mm即可,长方体时长宽高可分别取5-15mm、3-5mm和5-10mm,表面包裹厚度小于1mm的塑料膜。磁性材料4通过过盈配合卡放在育晶盒箱体1边角内侧的沟槽中,也可以通过胶黏剂粘接固定。

[0035] 固液材料5,用于固定沉淀液6,为高弹性多孔材料,需要与沉淀液6具有良好的相容性,其内部孔为开口孔相互连通,孔的横截面直径不大于0.5mm。固液材料5的外形和尺寸可根据复合结晶室2的实际内部空间要求,从大块材料上随用随切。可选用有机高分子材料,优选硅橡胶材料。

[0036] 沉淀液6,是与液相蛋白液8具有蒸汽压差或组分浓度差的液体,二者具有匹配性。沉淀液6不属于本发明必须的结构部件,但为了阐述原理和使用方法的方便,在此作为一零部件给出。沉淀液6的作用是吸收从液相蛋白液8中蒸发出来的水汽,并且/或者其中高浓度的组分借助与液相蛋白液8的接触而发生的液-液扩散进入到后者,其相同的效果是使液相蛋白液8逐渐过饱和,以便析出液相蛋白晶10。

[0037] 挡板7:作用是将沉淀液6与液相蛋白液8隔离开,仅在一个侧面和上沿留有缝隙,

使得两种液体在侧面直接接触以及在顶部借助汽相间接联通,也就是建立起液-液扩散和汽相扩散两个通道,如图6所示。优选方案为挡板7与育晶盒盒体1一体注塑,底部和一个侧面连接在一起,另一侧缝隙1-5mm,上沿处缝隙1-5mm。挡板7可以与复合结晶室2的侧壁平行,也可以不平行,如采取侧面有缝隙的一端更窄的结构,以实现特定的液-液扩散效果,有利于液相蛋白晶10的长大和内部质量。挡板7优选厚度范围0.1-0.5mm。

[0038] 液相蛋白液8,与沉淀液6类似,也不属于本发明必须的结构部件,只是为了阐述原理和使用方法的方便,而作为一零部件给出。液相蛋白液8的浓度和体积根据实际实验需求确定。

[0039] 固晶层9:作用是将液相蛋白液8中析出的液相蛋白晶10固定住,避免其移动位置,该层厚度0.2-1mm,采用具有三维网状分子结构的有机或无机材料,优选琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶,胶的质量浓度0.5%-1.5%。

[0040] 液相蛋白晶10,是液相蛋白液8中蛋白质分子有序聚集而析出的蛋白质晶体,它不是该发明的必需组成部件,为叙述工作原理方便而加入。

[0041] 吸液材料11,用于吸附固定平衡液12,为开口式多孔有机或无机材料,材料不与平衡液12发生化学反应,孔隙率90%以上,孔径小于1毫米,优选聚乙烯或聚碳酸酯。

[0042] 平衡液12,是具有比汽相蛋白液15更小蒸汽压差的液体,用于吸收从汽相蛋白液15蒸发出来的水,平衡液12也不是该发明的必需组成部件,为便于解释工作原理而加入。

[0043] U型板13,作用是将平衡液12与汽相蛋白液15隔离开,只在中间或边角位置留有缺口,使得从汽相蛋白液15蒸发出来的水蒸汽可以通过缺口到达平衡液12,进而被其吸收,也即形成汽相扩散通道,如图5所示。优选方案为U型板13与育晶盒盒体1一体注塑,底部和侧面连接在一起,上沿至中央有一矩形缺口,长5-8mm,宽3-6mm。U型板13一般与汽相结晶室3的侧壁平行,也可不平行。U型板13优选厚度0.1-0.5mm。

[0044] 吸晶层14,作用是把汽相蛋白液15中析出的汽相蛋白晶16锚定,以免其改变位置。吸晶层14优选厚度0.2-1mm,也可更大或更小。其材质为具有立体网状显微结构的有机或无机材料,优选琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶,胶的质量浓度0.3%-1.2%。

[0045] 汽相蛋白液15,不是本发明必需的结构部件,但为了更清楚阐述本发明的原理和使用方法,在此作为一零部件给出。汽相蛋白液15的组成、浓度和体积等参数根据实际实验需求确定。

[0046] 汽相蛋白晶16,是汽相蛋白液15中蛋白质分子有序排列而形成的蛋白质晶体,它不是该发明的必需组成部件,为叙述工作原理方便而加入。

[0047] 透光底板17,是汽相结晶室3的底,在复合育晶盒1采用一体式注塑结构时它不是独立部件。透光底板17采用与复合育晶盒1相同材质,当汽相结晶室3为独立模块时也可采用不同材质,如石英玻璃。板厚0.2-1.0mm。

[0048] 承液板18,是复合结晶室2的底,在复合育晶盒1为一体式注塑结构时它不是独立结构部件。承液板18采用与复合育晶盒1相同材质,当复合结晶室2为独立模块时也可以采用不同材质,如石英玻璃。板厚0.2-1.0mm。

[0049] 以上所述实施例仅表达了本发明的优选实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形、改进及替代,这些都属于本发

明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。



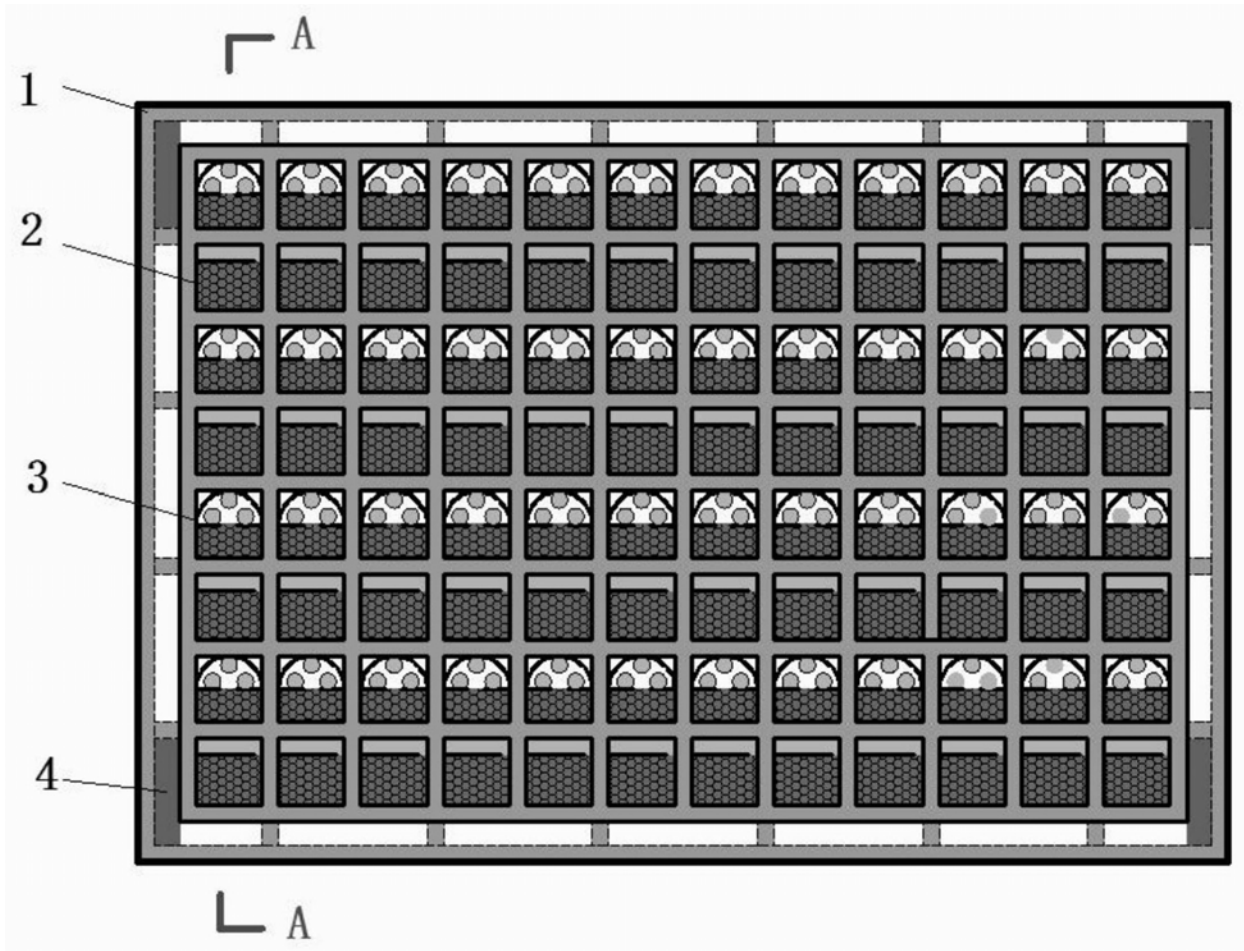


图1

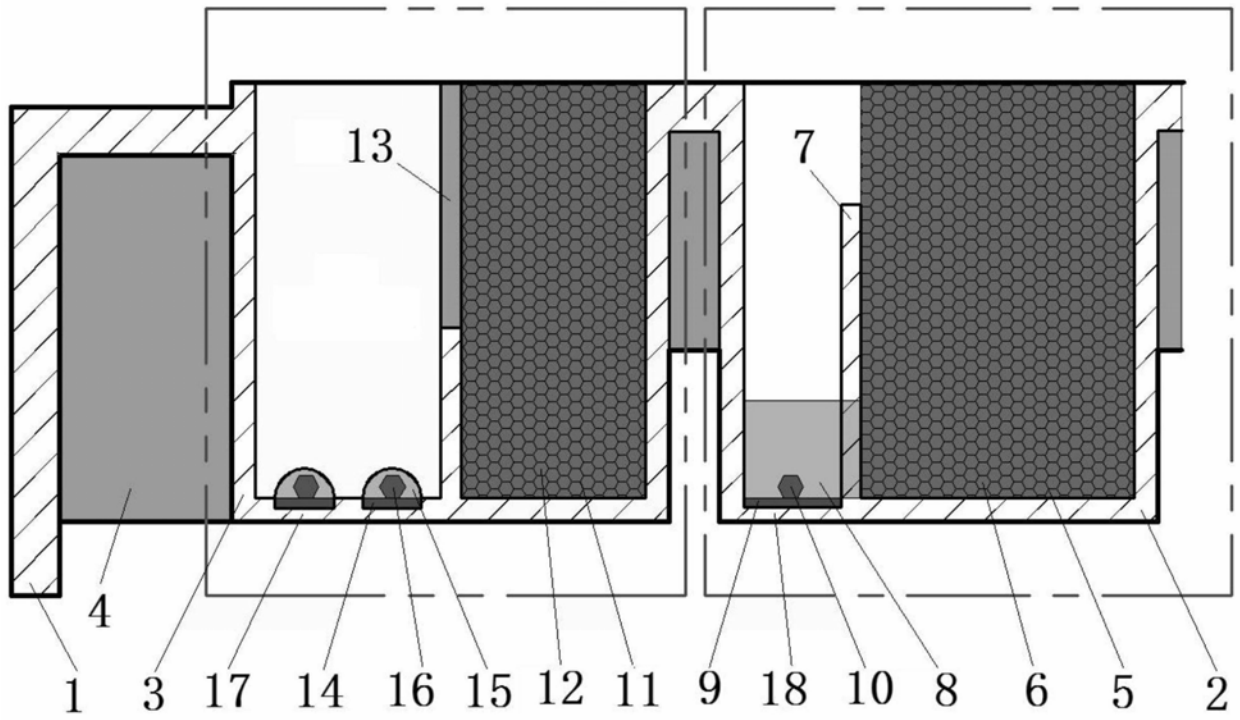


图2

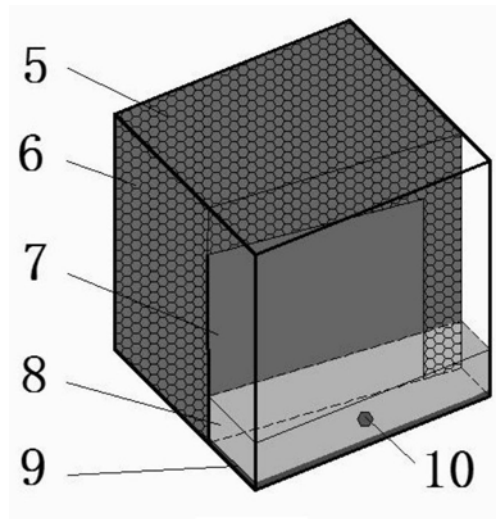


图3

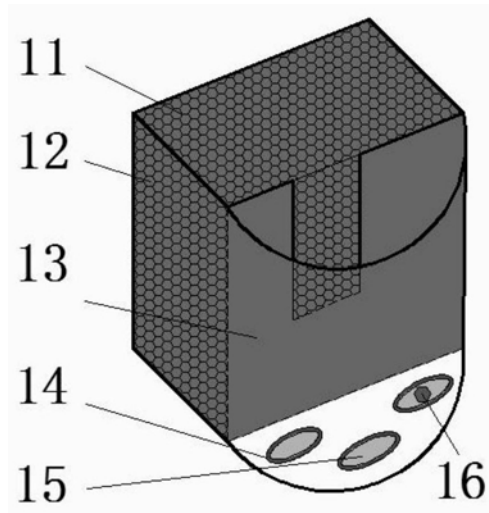


图4

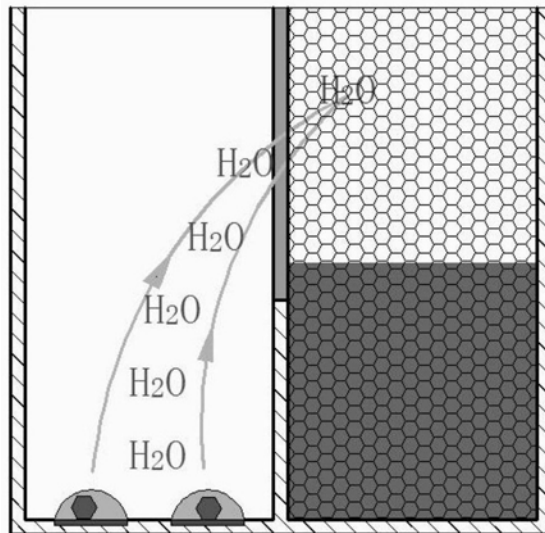


图5

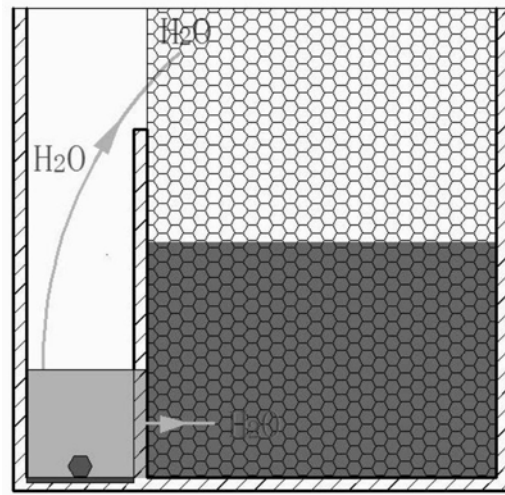


图6

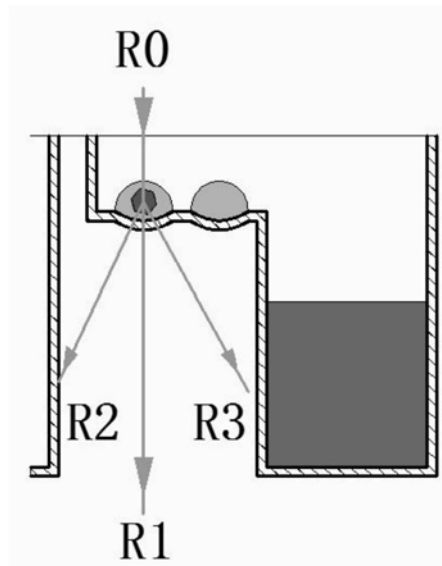


图7

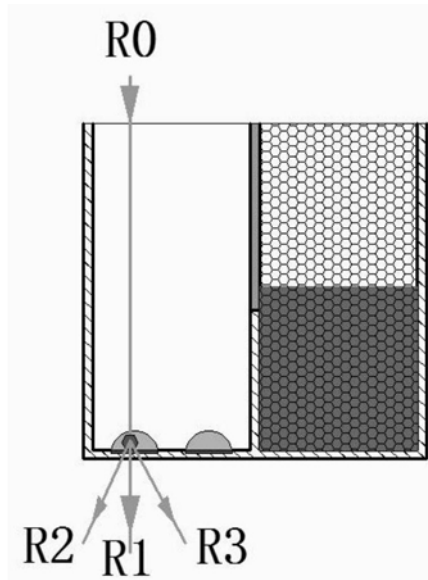


图8