



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110294790 A

(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201910508551.1

(22)申请日 2019.06.12

(71)申请人 南昌大学

地址 330000 江西省南昌市红谷滩新区学府大道999号

(72)发明人 何庆华 游凯豪 危泰龙

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司 11246

代理人 袁红梅

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表1页

(54)发明名称

Cry1Da蛋白的多肽配体分子及其应用

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,具体涉及可特异性结合Cry1Da蛋白的多肽配体分子及其应用,通过以Cry1Da蛋白为靶分子,投入噬菌体随机展示肽库,通过独特的负筛、缓冲液、包被时间、竞争物洗脱等亲和淘选条件,获得了一种可特异性结合Cry1Da蛋白的多肽分子,其氨基酸序列为:PSGGVLA。本发明所涉及的多肽分子可替代传统的Cry1Da抗体分子,作为Cry1Da的结合分子直接应用于免疫学检测分析,该多肽分子特异性强、结合性能高、结构稳定性、耐酸碱,制备简单快速等特点。

1. Cry1Da蛋白的多肽配体分子,其特征在于其氨基酸序列为:PSGGVLA。
2. 编码权利要求1所述多肽配体分子氨基酸序列的核苷酸。
3. 如权利要求2所述的核苷酸序列对应为:CCT TCT GGT GGT GTT CTT GCT。
4. 如权利要求1所述多肽配体分子制备方法,其特征在于通过噬菌体扩增、化学合成或基因工程重组表达的方式进行大量制备;所述噬菌体扩增是指将展示多肽分子的噬菌体,通过生物扩增的方式,大量繁殖生产展示有可特异性结合苏云金芽孢杆菌Cry1Da蛋白的多肽分子的噬菌体粒子;所述化学合成指依据多肽分子的氨基酸序列,通过化学合成多肽的方式进行多肽合成;所述基因工程重组表达的方式是指将编码多肽分子的基因,通过克隆至表达载体,以多肽-融合蛋白的形式进行大量制备。
5. 权利要求1所述多肽配体分子在免疫学检测分析中的应用。
6. 如权利要求5所述应用,其特征在于多肽配体分子替代传统的Cry1Da蛋白多克隆、单克隆抗体在免疫学检测分析中的应用。

Cry1Da蛋白的多肽配体分子及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及可特异性结合Cry1Da蛋白的多肽配体分子及其应用。

背景技术

[0002] 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)蛋白是一种广泛存在于土壤中的革兰氏阳性细菌所分泌的一种伴孢晶体内含物,对各类的靶昆虫具有杀虫活性,被称为杀虫晶体蛋白(ICP, Insecticidal Crystal Protein),又称为 δ -内毒素或Bt毒蛋白,是目前市面上Bt杀虫剂的主要成分。它以原毒素形式被目标昆虫摄入后,在昆虫中肠碱性环境中被特异蛋白酶水解,生成能耐受蛋白酶作用的蛋白。激活后的蛋白首先与中肠细胞膜上的特异性受体结合,然后插入到细胞膜中,形成溶解性孔洞,造成细胞释放其内含物,最终导致昆虫死亡。另外,Bt蛋白的抗虫转基因作物也已经推广至全球并取得很好的杀虫效果。Bt蛋白的种类有很多种,根据编码蛋白的杀虫谱和编码基因序列的同源性,可将Bt蛋白分为两大类:分别是晶体蛋白家族(Crystal protein, Cry)和细胞溶解蛋白家族(Cytolytic protein, Cyt)。其中的Cry基因又被分为4个类群,即Cry1、Cry2、Cry3、Cry4;根据氨基酸的同源性大小,在Cry1基因的基础上进一步分类为:Cry1A、Cry1B、Cry1C、Cry1D。伴随转基因作物的全球化,人们开始对转基因作物的安全性产生顾虑,而作为杀虫剂市场占有率最高的Bt蛋白,是否对人类存在威胁也越来越受到世界各国的关注。因此,对转基因食品中Bt蛋白的检测具有重要意义。

[0003] 目前对于Bt蛋白的检测主要依靠免疫学分析,其中以酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)尤其是双抗夹心ELISA最为常见。在双抗夹心ELISA中,抗原经过两种抗体(捕获抗体和检测抗体)的特异性选择,使这种方法的特异性和灵敏度都非常高。

[0004] 免疫学分析方法的核心在于抗原-抗体间的特异性识别及结合,因此制备特异性结合抗原的抗体就成为发展免疫学分析方法的前提与核心。抗体的研究近年来发展迅猛,已经从传统的多克隆、单克隆抗体,发展至以单链抗体、噬菌体展示抗体、单域重链抗体、抗独特型抗体等为代表的基因工程抗体领域。相比于传统抗体制备必须经历动物免疫、细胞融合、阳性克隆筛选等复杂程序,基因工程抗体以其可定向改造、淘选方便等优点已成为目前研究的热点。除此以外,近年来包括我国在内的众多学者已经开始着眼于不免疫球蛋白为主体组成结构的新型抗体研究,例如基于SELEX技术的核酸适配体、基于分子印迹聚合体技术的人工抗体以及基于Lipocalin蛋白家族的抗体类似物等都取得了可喜的进展,为传统抗体的替代性研究提供了扎实的理论和方法学基础。纵观抗体的发展动态,可以看出新型抗体具有分子量小、结构简单、可自我进化、制备快捷的特点及发展趋势。例如,单克隆抗体、单链抗体、单域重链抗体的分子量逐渐减少,分别为150、30-50、15-20kDa,以Lipocalin为骨架蛋白的抗体类似物为18-20kDa,而核酸适配体则仅为一小段核酸序列。

[0005] 近年来人们热衷于研究发展肽模拟物,目的之一是将具有生物活性的复杂分子逐

步修饰、取代、改造、最终压缩至仅包含功能单位的小分子,称之为肽模拟物的合理设计。因此,多肽分子可成为潜在的新型抗体分子。随着噬菌体展示多肽库技术的迅速发展,通过噬菌体展示肽库的淘选,无需动物免疫过程即可快速、简单地获得与特定靶体分子特异性结合的多肽分子。噬菌体展示肽库技术的主要特点是可有效地筛选出与目标靶体特异结合的噬菌体展示多肽,该技术在探索受体与配体之间相互作用结合位点、寻求高亲和力和生物活性的配体分子、探索未知蛋白质空间结构表位、新型疫苗的研制等方面应用广泛。

[0006] 本发明通过噬菌体展示多肽库技术,采用独特的亲和淘选方式,从噬菌体展示多肽库中快速筛选到能与Cry1Da蛋白特异性结合的多肽分子,该多肽分子具有与传统的Cry1Da多克隆、单克隆抗体分子相似的免疫学检测特性,可作为传统Cry1Da抗体的替代物应用于Cry1Da的免疫学分析体系。该方法避免了制备传统的单克隆抗体分子所需要的动物免疫、细胞融合、单克隆筛选等流程,具有无需免疫过程、筛选方便、周期短、制备成本低等特点。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供可特异性结合Cry1Da蛋白的多肽配体分子及其应用。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0009] 本发明以Cry1Da蛋白为靶分子,投入噬菌体随机展示肽库,通过独特的负筛、缓冲液、包被时间、竞争物洗脱等亲和淘选条件,获得了一种可特异性结合Cry1Da蛋白的多肽分子,其氨基酸序列为:PSGGVLA。

[0010] 上述多肽分子结构中,大写英文字母分别代表已知天然L-型氨基酸残基或其D-型异构体的一种,即S代表丝氨酸残基,L代表亮氨酸残基,P代表脯氨酸残基,G代表甘氨酸残基,V代表缬氨酸残基,A代表丙氨酸残基。

[0011] 本发明还涉及编码上述多肽分子氨基酸序列(PSGGVLA)的核苷酸,其序列为:

[0012] CCT TCT GGT GGT GTT CTT GCT

[0013] 本发明提及多肽分子可通过噬菌体扩增、化学合成或基因工程重组表达的方式进行大量制备。噬菌体扩增是指将展示有多肽分子的噬菌体,通过生物扩增的方式,大量繁殖生产展示有多肽分子的噬菌体粒子。化学合成是指依据公布的模拟表位的氨基酸序列,通过化学合成多肽的方式进行多肽合成。基因工程重组表达的方式是指将编码多肽分子的基因,通过克隆至表达载体,以多肽-融合蛋白的形式进行多肽分子的大量制备。

[0014] 本发明还涉及所述多肽分子在免疫学检测分析中的应用。免疫学检测的类型包括酶联免疫吸附检测等基于抗原-抗体特异性反应的免疫学分析检测类型。

[0015] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0016] 本发明所提及的多肽分子可替代传统的Cry1Da抗体分子,作为Cry1Da的结合分子直接应用于免疫学检测分析,该多肽分子特异性强、结合性能高、结构稳定性、耐酸碱,制备简单快速等特点。

具体实施方式

[0017] 实施例1. 与Cry1Da蛋白特异性结合多肽分子的亲和淘选及其鉴定

[0018] 1) 亲和淘选与Cry1Da蛋白特异性结合多肽分子的具体方法为:将酶标板放在超净

工作台紫外照射杀菌半小时后,将 $2\mu\text{g/mL}$ Cry1Da蛋白包被于酶标板孔($100\mu\text{L}/\text{孔}$),用灭菌的饭盒密封保存在 4°C 冰箱过夜。从 4°C 取出,在超净台中用PBST(10mMPBS , $\text{pH}7.4$,包含 0.8% Tween-20(v/v))洗涤8次,于灭菌吸水纸上拍干;加入 5% 明胶封闭液 37°C 孵育5小时。为获得特异性结合Cry1Da的多肽分子,减少非特异性结合,本发明在进行亲和淘选之前,将噬菌体随机展示多肽库(噬菌体展示七肽库,购自NEB公司,用PBS稀释噬菌体扩增液,约 $4.0\times 10^{11}\text{pfu}$)分别投入包被有BSA蛋白($10\mu\text{g/mL}$)、OVA蛋白($10\mu\text{g/mL}$)、脱脂牛奶($10\mu\text{g/mL}$)的酶标板孔中进行负筛,收集孔中上清液待用。取包被有Cry1Da蛋白的酶标板孔,用PBST洗涤4次,每孔加入 $100\mu\text{L}$ 经过上述负筛的孔上清, 37°C 振荡反应1小时。弃去未结合的噬菌体,用PBST洗涤6次,结合上的噬菌体用抗Cry1Da单克隆抗体进行竞争性洗脱8min,后用 1MTris-HCl ($\text{pH}9.0$)中和。取 $10\mu\text{L}$ 洗脱噬菌体测滴度,其余的用于感染 30mL 生长至对数前期的E.coli ER2738菌株进行扩增。第二天用PEG/NaCl沉淀纯化噬菌体,并测定扩增后噬菌体的滴度。

[0019] 然后依次进行第2轮和第3轮淘选,淘选步骤与第一轮大体相同,但之后两次每次加入的噬菌体量均为 $2\times 10^{11}\text{pfu}$,第2、3轮Cry1Da蛋白标准品的包被浓度分别为 $1\mu\text{g/mL}$ 和 $0.5\mu\text{g/mL}$,筛选的噬菌体展示多肽与包被了Cry1Da蛋白的板条孵育时间分别为15min、10min,洗涤液浓度分别为 1.0% PBST和 1.25% PBST。

[0020] 2) 阳性噬菌体克隆的鉴定:从第三轮淘选后测定噬菌体滴度的平板中随机挑取50个噬菌体斑,进行噬菌体的扩增,分别采用直接包被ELISA方法和夹心酶联免疫吸附检测方法进行阳性噬菌体克隆的鉴定。

[0021] 直接包被ELISA的具体方法为:包被Cry1Da蛋白于酶标板, 4°C 孵育过夜。第二天用PBST(10mM PBS , 0.05% Tween-20(v/v))洗涤3次后,用含有 5% 脱脂奶粉的PBS进行封闭, 37°C 孵育1小时,投入 $100\mu\text{L}$ 获得的阳性噬菌体扩增液,孵育30min。加入 $1:5000$ 倍稀释的HRP标记抗M13噬菌体二抗 $100\mu\text{L}$, 37°C 2孵育45min。加入 $100\mu\text{L}$ TMB底物液,避光显色6min,酶标仪读取 450nm 处的吸收值。包被BSA、OVA抗原作为阴性对照,其余ELISA操作方法相同。

[0022] 夹心酶联免疫吸附检测方法具体方法为:首先,用 10mM PBS ($\text{pH}7.4$)稀释抗Cry1Da单克隆抗体(编号1a)至 $1\mu\text{g/mL}$, $100\mu\text{L}/\text{孔}$,包被96孔酶标板, 4°C 孵育过夜。第二天用PBST(10mM PBS , 0.05% Tween-20(v/v))洗涤3次后,用含有 5% 脱脂奶粉的PBS进行封闭, 37°C 孵育1小时;加入Cry1Da蛋白标准品 50ng/mL , $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 37°C 孵育45min。投入 $100\mu\text{L}$ 待测噬菌体斑扩增液($1.0\times 10^{12}\text{pfu}$),以不含Cry1Da蛋白标准品的PBS溶液作为空白对照,以与Cry1Da蛋白特异性结合并标记辣根过氧化物酶的抗Cry1Da单克隆抗体(编号2b)为阳性对照,以原始噬菌体展示肽库稀释液为阴性对照, 37°C 孵育45min。除阳性对照孔外其余孔加入 $1:5000$ 倍稀释的HRP标记抗M13噬菌体二抗 $100\mu\text{L}$, 37°C 孵育45min。加入 $100\mu\text{L}$ TMB底物液,避光显色6min,酶标仪读取 450nm 处的吸收值。选取 OD_{450} 大于阴性对照2倍的噬菌体克隆为阳性克隆。

[0023] 3) 特异性结合Cry1Da多肽分子的结合性能鉴定:采用ELISA的方法进行特异性结合Cry1Da多肽分子的结合性能的鉴定,具体方法为:包被不同浓度的Cry1Da蛋白(0.01 、 0.25 、 0.5 、 1 、 5 、 10 、 20 、 40 、 100ng/mL)于酶标板, 4°C 孵育过夜。第二天用PBST(10mM PBS , 0.05% Tween-20(v/v))洗涤3次后,用含有 5% 脱脂奶粉的PBS进行封闭, 37°C 2孵育1小时,投入 $100\mu\text{L}$ 获得的阳性噬菌体扩增液,孵育30min。加入 $1:5000$ 倍稀释的HRP标记抗M13噬菌体二抗 $100\mu\text{L}$, 37°C 孵育45min。加入 $100\mu\text{L}$ TMB底物液,避光显色6min,酶标仪读取 450nm 处的

吸收值。结果显示包被了0.01、0.25、0.5、1、5、10、20、40、100ng/mL Cry1Da蛋白的孔的OD值分别为0.25、0.31、0.48、0.56、1.1、1.5、2.0、2.5、2.8,呈现良好的结合性能,阴性孔无色,显示未结合。

[0024] 4) 特异性结合Cry1Da多肽分子对于Cry1Da特异性的鉴定:采用ELISA的方法进行多肽分子与Cry1Ac、Cry1Ab同源蛋白的交叉反应鉴定,具体方法为:分别包被Cry1Ac、Cry1Ab蛋白于酶标板,4℃孵育过夜。第二天用PBST (10mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤3次后,用含有5%脱脂奶粉的PBS进行封闭,37℃孵育1小时,投入100μL经鉴定特异性结合Cry1Da的噬菌体克隆 (1.0×10^{11} pfu) 孵育30min。加入1:5000倍稀释的HRP标记抗M13噬菌体二抗100μL, 37℃孵育45min。加入100μL TMB底物液,避光显色6min,酶标仪读取450nm处的吸收值。若可特异性结合Cry1Da的多肽对Cry1Ac、Cry1Ab无交叉反应,则包被了Cry1Ac、Cry1Ab蛋白的孔应无光吸收值(OD)值。结果显示投入了Cry1Ac、Cry1Ab的酶标板孔中并无颜色,显示获得的抗Cry1Da的噬菌体克隆与Cry1Ac、Cry1Ab并不结合,具有优良的特异性。

[0025] 实施例2. 与Cry1Da特异性结合的多肽分子编码基因的测序及其氨基酸序列的确定

[0026] 将鉴定展示有特异性结合Cry1Da多肽分子的噬菌体进行扩增,提取噬菌体的DNA测序模板。简要过程如下:进行噬菌体扩增,在第一步离心后,将800μL含噬菌体上清转入一新离心管。加入200μL PEG/NaCl沉淀噬菌体。离心后将沉淀重悬于100μL碘化物缓冲液(10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 4M NaI), 加入250μL无水乙醇沉淀DNA,离心后再用70%乙醇洗涤沉淀(DNA测序模板)。沉淀最终重悬于20μL灭菌水,取2μL进行琼脂糖凝胶电泳分析;取5μL噬菌体模板进行DNA测序,其-96gIII测序引物为:5'-³²P CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'。依据DNA测序结果及密码子表可获得多肽分子的氨基酸序列:PSGGVLA。

[0027] 实施例3. 与Cry1Da特异性结合的多肽分子的大量制备

[0028] 1) 以噬菌体扩增的方式

[0029] 将与Cry1Da特异性结合的噬菌体加入至30ml接种有E.coli ER2738的培养物中, 37℃ 220rpm, 振荡培养4.5h。将培养物转入另一离心管中, 4℃ 8000rpm离心30min, 将上清的上部80%转入一新鲜管中, 加入1/6体积的PEG/NaCl, 4℃下静置过夜。4℃ 8000rpm离心PEG/NaCl静置溶液30min。弃上清, 1mL PBS重悬沉淀, 再加入200μL PEG/NaCl, 4℃下静置2h, 12000rpm离心10min, 再短暂离心后吸去残留上清液。加入200μL PBS进行重悬, 即为噬菌体扩增液。

[0030] 2) 以多肽-融合蛋白的方式进行制备

[0031] A. PCR扩增多肽分子的外源编码基因

[0032] PCR反应体系: (50μL)

	10 × PCR Buffer	5 μL
	dNTP Mixture (each for 2.5 mM)	4 μL
	M13KE insert extension primer (10 mM)	1 μL
[0033]	-96 gIII sequencing primer (10 mM)	1 μL
	噬菌体 DNA 模板	1 μL
	Pyrobest DNA Polymerase	0.5 μL
	灭菌 ddH ₂ O	37.5 μL

[0034] PCR反应条件:

[0035]	94℃	6 min	35 cycles
	94℃	25 sec	
	55℃	30 sec	
	72℃	30sec	
	72℃	12 min	

[0036] 采用PCR产物回收试剂盒纯化PCR产物,微量核酸定量仪定量。多肽分子的编码基因序列为:CCT TCT GGT GGT GTT CTT GCT

[0037] B. 外源编码基因及表达载体的双酶切

[0038] 分别采用ACC65I和EagI酶对外源编码基因和表达载体 (pMA1-pIII, NEB公司, 可表达MBP融合蛋白) 进行双酶切。

[0039] C. 酶切后产物的连接及转化

[0040] 将质粒pMA1-PIII和目的片段以1:15 (摩尔比) 混匀, 于20℃水浴连接12h, 取15μL连接产物加至100μL感受态细胞DH5α中, 充分混匀。冰浴35min后, 42℃水浴热激60s, 立即冰浴3min后补加800μLLB液体培养液, 37℃, 200rpm培养1h, 8000rpm离心5min, 吸去上清留取约300μL, 涂布于LB-A固体 (Amp) 培养基中, 37℃过夜培养, 得到亚克隆阳性克隆。

[0041] D. 克隆转化

[0042] 将上述步骤得到的亚克隆用天根试剂盒提取目的质粒, 取10μL至100μL感受态细胞TB1中, 充分混匀。冰浴20min后, 45℃水浴热激60s, 立即冰浴5min后补加800μLLB液体培养液, 37℃, 200rpm培养45min, 7000rpm离心6min, 吸去上清留取约300μL, 涂布于LB-A固体 (Amp) 培养基中, 37℃过夜培养, 得到阳性克隆。

[0043] E. 多肽-MBP融合蛋白的表达

[0044] 将上述获得的阳性克隆子, 从平板上挑一单菌落接种于5mLLB-A, 0.5%蔗糖中, 37℃, 220r/min, 振荡培养过夜, 将过夜培养物按1%接种量 (v/v) 接种于50mL的LB-A, 0.2%蔗糖培养基中, 分别接种3瓶, 37℃, 220r/min振荡培养, 当培养物细菌浓度OD₆₀₀达到0.6时, 向三瓶培养物中加入IPTG至终浓度为0.3mmol/L, 120r/min振荡培养, 将诱导物 (IPEG溶液) 于4℃, 5000g, 离心15min收集菌体沉淀, 弃上清。重悬细胞于400mL 30mM Tris-HCl, 25%蔗糖, pH8.0 (80mL/g细胞湿重), 加入EDTA至1mM, 室温下震荡5-10min, 8000g, 4℃离心15min, 弃上清, 沉淀重悬于400mL预冷的5mM MgSO₄, 冰上震荡15min, 8000g, 4℃, 离心20min, 保留上清, 向上清液中加入8mL 1M Tris-HCl, pH7.4, 获得多肽-MBP融合蛋白, 可将该融合蛋白

作为抗体直接用于ELISA等基于抗原抗体的免疫检测体系中用于Cry1Da的检测。

[0045] 实施例4.特异性结合Cry1Da多肽分子在ELISA中的应用

[0046] (1) 样品提取

[0047] 称取5g待测样品,加入25mL PBS-甲醇溶液,200rpm振荡5分钟;将提取液用whatman1号滤纸进行过滤后,取1mL滤液加入1mL PBS(磷酸盐缓冲液,pH=7.2)混匀后,即为样品提取液,待用。

[0048] (2) 包被及封闭

[0049] 1.直接检测方法

[0050] 将提取液直接包被于酶标板,4℃孵育过夜。第二天用PBST(10mMPBS,0.05% Tween-20(v/v))洗涤3次后,用含有5%脱脂奶粉的PBS进行封闭,37℃孵育1小时。

[0051] 2.夹心ELISA方法

[0052] 用10mM PBS(pH7.4)稀释的抗Cry1Da单克隆抗体(1μg/ml),包被酶标板,4℃孵育过夜。第二天用PBST(10mM PBS,0.05% Tween-20(v/v))洗涤3次后,用含有5%脱脂奶粉的PBS进行封闭,37℃孵育1小时后,用PBST洗板6次超净台吹干4℃保存待用。

[0053] (3) 标准曲线的建立

[0054] A.基于直接检测方法

[0055] 取出板条,每孔投入100μL倍比稀释的Cry1Da蛋白标准品(浓度范围为0-2000ng/mL),100μL/孔,37℃孵育45min。投入100μL展示有特异性结合Cry1Da多肽分子的噬菌体(1.0×10^{11} pfu)或表达的多肽-MBP融合蛋白。加入1:5000倍稀释的HRP标记抗M13噬菌体二抗100μL或酶标记抗MBP抗体,37℃孵育45min。然后用TMB底物显色,读取OD₄₅₀建立ELISA标准曲线。结果显示:该标准曲线的线性检测范围为0.1-200ng/mL。

[0056] B.夹心ELISA方法

[0057] 取出经步骤(2)处理好的板条,每孔投入100μL倍比稀释的Cry1Da蛋白标准品(浓度范围为0-2000ng/mL),100μL/孔,37℃孵育45min。投入100μL展示有特异性结合Cry1Da多肽分子的噬菌体(1.0×10^{11} pfu)或表达的多肽-MBP融合蛋白。加入1:5000倍稀释的HRP标记抗M13噬菌体二抗100μL或酶标记抗MBP抗体,37℃孵育45min。然后用TMB底物显色,读取OD₄₅₀建立夹心ELISA标准曲线。结果显示:该标准曲线的线性检测范围为0.01-130ng/mL。

[0058] (4) 样品的检测

[0059] 取出经步骤(2)处理好的板条,分别按照直接或夹心ELISA方法进行操作,根据标准曲线,倒推出样品中Cry1Da的含量。

[0060] 实施例5.与Cry1Da特异性结合多肽分子的免疫学检测稳定性实验

[0061] 耐酸碱性实验

[0062] 将可与Cry1Da特异性结合的噬菌体展示多肽分子/多肽-MBP融合蛋白及Cry1Da单克隆抗体分别用pH=4.0,5.0,6.0,7.4,8.0的缓冲液稀释成工作液,分别进行ELISA测定,具体方法为:包被Cry1Da蛋白于酶标板,4℃孵育过夜。第二天用PBST(10mM PBS,0.05% Tween-20(v/v))洗涤3次后,用含有5%脱脂奶粉的PBS进行封闭,37℃孵育1小时,投入100μL分别用pH=4.0,5.0,6.0,7.4,8.0的缓冲液稀释成工作液的Cry1Da特异性结合的多肽分子或Cry1Da单克隆抗体,孵育30min。加入1:5000倍稀释的HRP标记抗M13噬菌体二抗或抗IgG二抗100μL,37℃孵育45min。加入100μLTMB底物液,避光显色6min,酶标仪读取450nm处

的吸收值。

[0063] 实验结果显示：以多肽分子作为Cry1Da识别元件的夹心ELISA，在pH=5.0,6.0,7.4,8.0时，其OD值保持恒定；以Cry1Da单克隆抗体为识别元件的ELISA，在pH=5.0,6.0,8.0时OD值呈现无规律性变化，抗体的免疫学分析性能受到显著影响，表明作为Cry1Da抗体替代物的多肽分子具有更好的酸碱耐性。

序列表

<110> 南昌大学

<120> Cry1Da蛋白的多肽配体分子及其应用

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Pro Ser Gly Gly Val Leu Ala

1 5

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

ccttctggtg gtgttcttgc t 21

专利名称(译)	Cry1Da蛋白的多肽配体分子及其应用		
公开(公告)号	CN110294790A	公开(公告)日	2019-10-01
申请号	CN201910508551.1	申请日	2019-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	何庆华		
发明人	何庆华 游凯豪 危泰龙		
IPC分类号	C07K7/06 C12N15/11 C12N15/63 G01N33/53		
CPC分类号	C07K7/06 C12N15/63 G01N33/53 G01N2333/325		
代理人(译)	袁红梅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，具体涉及可特异性结合Cry1Da蛋白的多肽配体分子及其应用，通过以Cry1Da蛋白为靶分子，投入噬菌体随机展示肽库，通过独特的负筛、缓冲液、包被时间、竞争物洗脱等亲和淘选条件，获得了一种可特异性结合Cry1Da蛋白的多肽分子，其氨基酸序列为：PSGGVLA。本发明所涉及的多肽分子可替代传统的Cry1Da抗体分子，作为Cry1Da的结合分子直接应用于免疫学检测分析，该多肽分子特异性强、结合性能高、结构稳定性、耐酸碱，制备简单快速等特点。

10 × PCR Buffer	5 μL
dNTP Mixture (each for 2.5 mM)	4 μL
M13KE insert extension primer (10 mM)	1 μL
-96 gIII sequencing primer (10 mM)	1 μL
噬菌体 DNA 模板	1 μL
Pyrobest DNA Polymerase	0.5 μL
灭菌 ddH ₂ O	37.5 μL