



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107513099 A

(43)申请公布日 2017. 12. 26

(21)申请号 201710310115.4

(22)申请日 2017.04.28

(71)申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道639号

(72)发明人 王旻 邱郑 强旭

(51)Int. Cl.

C07K 7/08(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/547(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表1页 附图3页

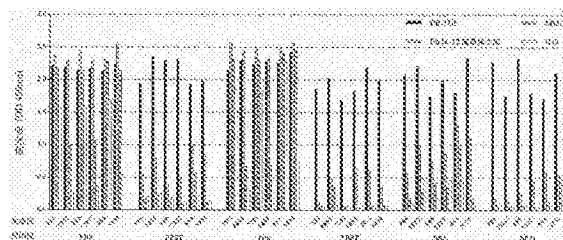
(54)发明名称

一种聚苯乙烯亲和肽及其用于改善抗原固定效果的方法

(57)摘要

本发明公开了一种能与聚苯乙烯特异性结合的多肽序列及其改善多肽及蛋白质类抗原在聚苯乙烯材料表面固定化的方法。通过噬菌体展示随机肽库筛选,得到一种能与聚苯乙烯亲和结合的多肽PB-TUP,其氨基酸序列为:Val-His-Trp-Asp-Phe-Arg-Gln-Trp-Trp-Gln-Pro-Ser;其编码核苷酸序列为GTG-CAT-TGG-GAT-TTT-CGG-CAG-TGG-TGG-CAG-CCT-TCT。本发明具有如下优势:1、亲和肽PB-TUP对聚苯乙烯载体有较强的亲和结合能力。2、亲和肽PB-TUP与多肽或蛋白抗原相融合,可有效改善抗原的固定效果。3、亲和肽PB-TUP可引导融合抗原以统一有序的方式固定至聚苯乙烯表面,由此保持抗原的空间构象,避免了抗原活性位点被遮蔽而失活;4、本发明可应用于以聚苯乙烯为固定载体的酶联免疫、生物学及细胞学检测,以及生物传感器及微阵列芯片等诊断检验技术,提高有效提高检测灵敏度。

度。



1. 一种肽,对固相聚苯乙烯材料具有亲和吸附功能。其特征在于其氨基序列为:
Val-His-Trp-Asp-Phe-Arg-Gln-Trp-Trp-Gln-Pro-Ser。
2. 一种编码此亲和肽的核酸序列,其特征在于其核苷酸序列为:
GTG-CAT-TGG-GAT-TTT-CGG-CAG-TGG-TGG-CAG-CCT-TCT。
3. 一种固相抗原的方法,其特征在于:通过固相合成法在蛋白或多肽的N末端或C末端偶联PB-TUP多肽序列,或通过连接肽偶联PB-TUP多肽序列,其氨基酸序列为权利要求1所述氨基酸序列;通过将亲和肽PB-TUP的编码核苷酸序与蛋白或多肽的表达序列相融合,利用表达载体,用基因工程的方法在原核细胞或真核细胞中表达亲和肽PB-TUP融合多肽或蛋白,所述核苷酸序列为权利要求2所述核苷酸序列。

一种聚苯乙烯亲和肽及其用于改善抗原固定效果的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种亲和肽序列PB-TUP,该肽可特异性结合聚苯乙烯材料。以及该肽在改善多肽及蛋白质在聚苯乙烯材料表面固定效果的方法。

背景技术

[0002] 噬菌体展示技术于1985年由George P.Smith创建,通过将噬菌体工程化改造,在保证其侵染能力和繁殖能力的情况下,使外源氨基酸序列展示于衣壳蛋白末端。通过至少三轮的吸附,洗脱,扩增的生物筛选程序,从众多随机的噬菌体中,富集得到同靶标有特异性亲和能力的噬菌体。通过对噬菌体DNA测序,可鉴定与靶标结合的多肽编码核酸序列,并得到其编码多肽的氨基酸序列。噬菌体展示技术不仅广泛应用于医药领域的基础研究和药物开发,还可应用于材料科学领域,通过筛选获得可与固相材料结合的多肽序列,介导生物分子与非生物材料界面的相互作用。

[0003] 多肽,尤其是小分子多肽,由于吸附能力很弱,不能直接包被固相材料如聚苯乙烯,用于酶联免疫吸附实验(ELISA)和其他方面的研究。采用经过特殊处理的固相材料,可以提高小分子多肽的吸附,但也会在很大程度上增加成本。人们常将小分子多肽与大分子蛋白如BSA偶联,再包被固相材料,用于检测和研究。这种方法不仅耗时,需多步反应以促使肽和材料结合,而且还存在生物分子在偶联过程中因空间构象改变而导致生物学活性丧失的情况。另外多肽和蛋白质在固相表面的非特异性吸附是无序的,没有方向性,部分蛋白或多肽会因构象改变或活性位点被遮蔽而失去功能,从而影响检测或后续研究的灵敏度和准确性。

[0004] 聚苯乙烯亲和肽在蛋白质或多肽的固定方面具有优势及应用前景。将亲和肽与目的蛋白或多肽相融合,不仅可以提高多肽或蛋白对聚苯乙烯材料的吸附,还可在不影响构象及活性位点的前提下使多肽或蛋白与固相表面结合,是一种简单易行的定向固定方法。

发明内容

[0005] 1.发明目的

[0006] 本发明的目的是为了获得一种同聚苯乙烯材料具有特异性结合作用的多肽序列,以及利用该亲和肽提高多肽及蛋白在聚苯乙烯表面的固定效果。

[0007] 2.技术方案

[0008] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案如下:

[0009] 运用噬菌体展示十二肽库通过生物筛选得到同聚苯乙烯材料具有特异性亲和作用的噬菌体克隆PB-TUP,并通过测序得到展示于该噬菌体表面的多肽序列。

[0010] 选用不同封闭液与洗涤液,通过酶联免疫吸附实验比较不同实验条件下PB-TUP噬菌体克隆与对照噬菌体克隆(即噬菌体十二肽文库、野生型M13KE噬菌体克隆以及无关肽噬菌体克隆D12)同聚苯乙烯材料的结合能力,验证PB-TUP噬菌体与聚苯乙烯材料结合的特异性。

[0011] 排除PB-TUP噬菌体与封闭液脱脂牛奶结合导致假阳性的可能性。为了排除假阳性,在酶联免疫吸附试验中使用不同浓度的脱脂牛奶进行封闭。观察PB-TUP的吸附是否随脱脂牛奶浓度的增加而变化。

[0012] 排除二抗非特异性吸附于聚苯乙烯表面导致假阳性的可能性。酶联免疫吸附实验中的二抗(检测抗体)缀连有HRP,如果封闭不彻底或洗涤过度将导致封闭位点暴露,使二抗非特异性吸附于聚苯乙烯表面,导致假阳性的发生。为了排除假阳性,确认PB-TUP噬菌体与聚苯乙烯的特异性结合,采取以下两个方案进行验证:一、在酶联免疫吸附实验中,在加入二抗前增加封闭步骤,以消除因封闭不足或洗涤过度造成的封闭位点暴露,减少二抗的非特异性吸附;二、洗脱回收与聚苯乙烯结合的噬菌体,进行滴度检测,与酶联免疫吸附实验进行比较以排除假阳性的可能。

[0013] 排除因噬菌体扩增优势导致假阳性的可能性。扩增时由于噬菌体克隆的生长速率不一,具有增长优势的噬菌体经四轮扩增后可能得到富集。为排除这种可能性,测定PB-TUP噬菌体克隆与对照噬菌体克隆(即噬菌体十二肽文库、野生型M13KE噬菌体克隆以及无关肽噬菌体克隆D12)的扩增曲线。

[0014] PB-TUP噬菌体与聚苯乙烯结合的浓度依赖性研究。进行酶联免疫吸附实验以及测定回收噬菌体滴度,检测PB-TUP与聚苯乙烯结合的量效关系。

[0015] pH环境对PB-TUP噬菌体克隆与聚苯乙烯结合的影响研究。

[0016] PB-TUP多肽改善多肽对聚苯乙烯吸附能力的研究。多肽P2由22个氨基酸组成,是本研究小组前期设计的一种具有内皮细胞粘附功能的多肽,已申报专利(ZL201210258041.1)。P2分子量小,对聚苯乙烯的吸附作用很弱,难以直接包被聚苯乙烯微孔板,进行酶联免疫吸附实验和其他研究。通过固相合成的方法将PB-TUP多肽序列的C末端通过六氨基己酸与P2的N末端相连得到融合肽PB-TUP-P2。通过酶联吸附免疫实验验证亲和肽改善多肽固定化的效果,并与BSA偶联的P2进行比较。

[0017] 多肽P2可与整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 相互作用,具有内皮细胞粘附功能。利用内皮细胞粘附实验检测融合肽PB-TUP-P2是否保留原多肽P2的空间构象和功能位点。

[0018] 3.有益结果

[0019] 本发明具有如下优势:

[0020] (1) 本发明通过以上实验证明该亲和肽PB-TUP对聚苯乙烯载体有较强的特异结合能力;

[0021] (2) 本发明PB-TUP序列与多肽或蛋白抗原相融合,可有效改善抗原的固定效果;

[0022] (3) 本发明PB-TUP序列可引导融合抗原以统一有序的方式固定至聚苯乙烯表面,由此保持抗原的空间构象,避免了抗原活性位点被遮蔽而失活;

[0023] (4) 本发明可应用于以聚苯乙烯为固定载体的酶联免疫、生物学及细胞学检测,以及生物传感器及微阵列芯片等诊断检验技术,提高有效提高检测灵敏度。

附图说明:

[0024] 图1.不同封闭液和洗涤液条件下,各噬菌体克隆与聚苯乙烯的结合能力研究。

[0025] 图2.不同浓度脱脂牛奶对PB-TUP噬菌体与聚苯乙烯结合的影响。

[0026] 图3.二抗与聚苯乙烯结合的研究。图3A加入二抗前增加封闭步骤对PB-TUP噬菌体

与聚苯乙烯结合的影响;图3B聚苯乙烯结合噬菌体的滴度测定。

[0027] 图4.PB-TUP噬菌体与对照噬菌体克隆扩增速率研究。

[0028] 图5.PB-TUP与聚苯乙烯结合的浓度依赖性研究。图5A酶联免疫吸附实验检测不同浓度噬菌体与聚苯乙烯结合的量效关系;图5B不同浓度噬菌体与聚苯乙烯结合的滴度测定。

[0029] 图6.pH环境对PB-TUP噬菌体与聚苯乙烯结合的影响。

[0030] 图7.多肽PB-TUP-P2与多肽P2对聚苯乙烯的结合研究。

[0031] 图8.多肽PB-TUP-P2与多肽P2对人血管内皮细胞的粘附实验。

具体实施方式

[0032] 下面将结合实施例附图对本发明作进一步说明。

[0033] 实施例1

[0034] 筛选同聚苯乙烯材料微孔板具有特异性亲和作用的序列

[0035] 实验方法:

[0036] 一、生物淘选程序

[0037] 1.封闭:每孔加入250 μ L 3% (w/v) BSA-TBS溶液于37 $^{\circ}$ C封闭聚苯乙烯微孔板2h。

[0038] 2.孵育:弃去封闭液并快速洗涤后将100 μ L噬菌体十二肽文库加入微孔板于37 $^{\circ}$ C孵育1h。

[0039] 3.非特异性洗涤:使用含0.05% (v/v) Tween-TBS溶液洗涤微孔5至15次,再使用TBS洗涤3次。

[0040] 4.特异性洗脱:弃去洗涤液,加入150 μ L 100mM HCl-Glycine (pH 2.2) 溶液10min后立即加入9 μ L 2M Tris-HCl (pH 9.1) 溶液中和已洗脱噬菌体。

[0041] 5.扩增:取5 μ L此溶液用于噬菌体滴度测定并将剩余溶液投入25mL处于对数生长期(OD600nm 0.4~0.6) ER2738菌液,剧烈扩增4.5~5h。

[0042] 6.离心:将培养物收集至一灭菌离心管中,4 $^{\circ}$ C10000rpm离心10min。

[0043] 7.浓缩:将噬菌体上清转移至另一灭菌离心管中并加入1/5体积20% (w/v) PEG-8000/2.5M NaCl溶液,于4 $^{\circ}$ C沉淀过夜。

[0044] 8.纯化:离心后弃去上清,用1mL 1% (w/v) BSA-TBS溶液将噬菌体沉淀重悬后收集,并作为下一轮淘选投入噬菌体并检测其滴度。

[0045] 9.共循环四轮该生物淘选程序。

[0046] 二、噬菌体滴度测定

[0047] 1.培养基的准备及预热:融化上层LB半固体培养基(含0.4%琼脂)分装为3mL于灭菌EP管中水浴45 $^{\circ}$ C备用。准备下层LB/1PTG/Xga1固体平板并于37 $^{\circ}$ C预温。

[0048] 2.梯度稀释噬菌体的准备:将噬菌体10倍系列稀释于1mL LB培养基中,准备培养至对数生长期的ER2738培养物并分装为200 μ L于灭菌离心管中。

[0049] 3.侵染:向每管ER2738培养物中加入10 μ L不同稀释度噬菌体后混匀,室温温育5~10min。

[0050] 4.测定:将已感染的ER2738培养物加入45 $^{\circ}$ C预温的上层半固体培养基中,快速混匀后立即倾注于37 $^{\circ}$ C预温下层平板上均匀铺开。待平板冷却后倒置于37 $^{\circ}$ C培养过夜。计数

平板上蓝色噬菌斑数并计算空斑形成单位 (pfu/mL) 滴度。

[0051] 三、酶联免疫吸附实验。

[0052] 1. 封闭: 聚苯乙烯微孔板每孔加入250 μ L 3% (w/v) 脱脂牛奶-TBS (NFM-TBS) 溶液于37 $^{\circ}$ C封闭2h。

[0053] 2. 噬菌体的孵育: 将已扩增的各克隆噬菌体上清100 μ L加入到已封闭的微孔板中4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0054] 3. 洗涤: 使用含0.05% (v/v) Tween-TBS (TBST) 溶液洗涤微孔3次, 再使用TBS洗涤3次。

[0055] 4. 二抗的孵育: 每孔加入100 μ L HRP-鼠抗M13抗体 (1:5000稀释) 于37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0056] 5. 洗涤: 使用TBST溶液洗涤微孔3次, 再使用TBS洗涤3次。

[0057] 6. 显色并测定: 每孔加入100 μ L HRP底物液显色5至15min, 加入50 μ L 2M稀硫酸终止后于OD450nm检测吸光值。

[0058] 实验结果:

[0059] 根据ELISA实验结果, 挑取吸光值较高克隆测序。结果发现存在一有序列, 因此将其作为同聚苯乙烯材料微孔板具有特异性亲和作用的序列PB-TUP进一步验证。

[0060] 实施例2

[0061] 比较酶联免疫吸附实验不同封闭液和洗涤液条件下各噬菌体克隆同聚苯乙烯材料的结合能力实验

[0062] 实验方法:

[0063] 1. 溶液的准备: 分别准备PBS、0.05% PBST、TBS、0.05% TBST、3% BSA-TBS及3% NFM-TBS六种不同溶液作为封闭液和洗涤液。

[0064] 2. 封闭: 分别使用以上六种溶液将聚苯乙烯微孔板于37 $^{\circ}$ C封闭2h。

[0065] 3. 噬菌体的孵育: 将 10^{10} (pfu/mL) PB-TUP噬菌体克隆、噬菌体十二肽文库、野生型M13KE噬菌体克隆以及无关肽噬菌体克隆D12作为实验组及对照组, 分别加入经不同封闭液处理的各聚苯乙烯微孔内, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0066] 4. 洗涤: 将以上六种溶液作为不同洗涤液分别洗涤5次

[0067] 5. 二抗的孵育和检测: 加入二抗孵育并进行实施例1中ELISA检测后续步骤。

[0068] 实验结果:

[0069] 如图1所示, 在使用不同封闭液和洗涤液条件下, 与其他三种对照克隆相比, PB-TUP噬菌体克隆对聚苯乙烯材料有显著的结合。其中PBS和TBS对所有噬菌体几乎无封闭或洗涤作用, 且洗涤力度较弱因而造成结果普遍较高, 无法排除假阳性结果, 而3% NFM-TBS具有较强的封闭作用, 能普遍降低噬菌体与固相材料的非特异性结合; 0.05% TBST具有较好的洗涤效果, 能够有效去除因不牢固结合而产生非特异性吸附的噬菌体克隆, 从而排除假阳性结果。因此后续实验将选用NFM-TBS作为封闭液、0.05% TBST作为洗涤液进行一系列ELISA实验, 并将PB-TUP噬菌体克隆作为同聚苯乙烯材料具有特异性亲和作用的肽序列。

[0070] 实施例3

[0071] 排除噬菌体吸附于封闭液脱脂牛奶中的蛋白质导致假阳性的可能性

[0072] 实验方法:

[0073] 1. 封闭: 每孔加入不同浓度 (0.00%至3.20%) NFM-TBS于37 $^{\circ}$ C封闭2h。

[0074] 2.噬菌体的孵育:将滴度为 10^{10} (pfu/mL) PB-TUP噬菌体克隆、噬菌体十二肽文库、野生型M13KE噬菌体克隆以及无关肽噬菌体克隆D12作为实验组及对照组,分别加入经不同浓度封闭液处理的各聚苯乙烯微孔内,4℃孵育过夜。

[0075] 3.洗涤:使用0.05% TBST溶液洗涤微孔5次。

[0076] 4.二抗的孵育和检测:加入二抗孵育并进行实施例1中ELISA检测后续步骤。

[0077] 实验结果:

[0078] 结果如图2所示,NFM-TBS封闭液对所有噬菌体克隆与聚苯乙烯均有抑制作用,并呈浓度依赖性。PB-TUP噬菌体的结合效应并未随NFM浓度的提高而加强,排除了PB-TUP因结合脱脂牛奶产生假阳性的可能性。说明PB-TUP序列亲和吸附于聚苯乙烯而并非结合于封闭液NFM-TBS。

[0079] 实施例4

[0080] 排除二抗非特异性吸附于聚苯乙烯表面导致假阳性的可能性

[0081] 实验方法:

[0082] 一、增加封闭步骤

[0083] 在酶联免疫吸附实验加入二级抗体步骤前,增加3% NFM-TBS于37℃封闭1h步骤,并原常规步骤结果比较。

[0084] 二、洗脱并检测回收噬菌体滴度

[0085] 1.封闭:每孔加入250μL 3% NFM-TBS溶液于37℃封闭聚苯乙烯微孔板2h。

[0086] 2.噬菌体的孵育:将滴度为 10^{10} (pfu/mL) 各克隆噬菌体上清100μL加入到已封闭的微孔板中4℃孵育过夜。

[0087] 3.洗涤:使用含0.05% TBST溶液洗涤微孔5次。

[0088] 4.洗脱并回收噬菌体:向各孔中加入100μL 100mM HCl-Glycine (pH 2.2) 溶液,孵育10min后立即加入6μL 2M Tris-HCl (pH 9.1) 溶液中和回收噬菌体。

[0089] 5.测定噬菌体滴度:根据实施例1中滴度测定方法检测各噬菌体克隆回收情况。

[0090] 实验结果:

[0091] 结果如图3所示。图3A为加入二抗前增加封闭步骤对PB-TUP噬菌体结合聚苯乙烯的影响。增加封闭步骤后OD450nm处吸光值结果与原步骤结果一致,各噬菌体克隆吸光值均无显著差异。图3B为聚苯乙烯结合的噬菌体回收及滴度测定。比较ELISA结果与洗脱检测噬菌体回收滴度,在两种实验中PB-TUP噬菌体克隆吸光值或回收滴度均显著高于对照克隆。因此排除了二级抗体的非特异性结合影响,可证明此PB-TUP序列与聚苯乙烯的高亲和力。

[0092] 实施例5

[0093] PB-TUP噬菌体与对照噬菌体克隆扩增速率研究,排除PB-TUP序列噬菌体为扩增优势噬菌体的可能性。

[0094] 实验方法:

[0095] 分别将 10^6 PB-TUP噬菌体克隆、噬菌体十二肽文库、野生型M13KE噬菌体克隆以及无关肽噬菌体克隆D12噬菌体颗粒投入25mL处于对数生长期ER2738菌液中,以实施例1中的方法进行扩增5h。设置1h,2h,3h,4h,5h共五个时间点,于每个时间点各取50μL培养物检测其中噬菌体克隆滴度并绘制扩增曲线,以探究各噬菌体克隆的扩增速率情况。

[0096] 实验结果:

[0097] 各克隆扩增情况如图4所示, PB-TUP噬菌体克隆与噬菌体十二肽文库及无关肽噬菌体克隆D12增殖速率相比并无显著差异, 从而证明此PB-TUP噬菌体克隆为非扩增优势噬菌体。野生型M13KE噬菌体克隆因其未插入外源序列, 因此保留原有增殖能力而具有扩增优势, 此结论同以前研究相一致。证明了此PB-TUP序列与聚苯乙烯的特异性结合而在各轮筛选中得以富集。

[0098] 实施例6

[0099] PB-TUP噬菌体与聚苯乙烯结合的浓度依赖性研究

[0100] 实验方法:

[0101] 分别将滴度为 10^6 、 10^8 、 10^{10} 、 10^{12} 的PB-TUP噬菌体克隆、噬菌体十二肽文库、野生型M13KE噬菌体克隆以及无关肽D12噬菌体克隆投入已封闭处理的聚苯乙烯微孔板内, 以实施例4的实验方法分别进行常规酶联免疫吸附实验实验, 同时回收与聚苯乙烯材料结合的噬菌体并测定滴度。比较两种实验方法中加入噬菌体浓度同实验结果的关系。

[0102] 实验结果:

[0103] 如图5所示, ELISA和回收滴度检测均表明, 该PB-TUP克隆均展示出与聚苯乙烯结合呈浓度依赖性, 进一步证明PB-TUP对聚苯乙烯的特异性结合能力。

[0104] 实施例7

[0105] pH环境对PB-TUP噬菌体克隆与聚苯乙烯结合的影响

[0106] 实验方法:

[0107] 为检测不同pH环境中各噬菌体与聚苯乙烯结合情况, 将滴度为 10^{10} 噬菌体加入不同pH (2、4、6、8、10、12) 磷酸缓冲溶液, 并根据实施例1中的方法进行酶联免疫吸附实验, 检测各克隆与聚苯乙烯材料的结合能力。

[0108] 实验结果:

[0109] pH环境对PB-TUP噬菌体克隆与聚苯乙烯材料结合的影响如图6所示, 在酸性和碱性环境中, 其结合能力均可增强。

[0110] 实施例8

[0111] PB-TUP多肽改善多肽P2固定效果研究

[0112] P2肽与PB-TUP-P2肽由上海吉尔生化有限公司合成, 纯度大于等于95%。

[0113] 实验方法:

[0114] 一、多肽PB-TUP-P2与多肽P2对聚苯乙烯的结合研究

[0115] 1. 包被: 将两种多肽以及BSA-P2偶联物分别溶解于pH 9.6包被液中并调整为不同浓度 (10至100 μ M) 以及不同稀释度 (1:100至1:5000), 分别加入聚苯乙烯微孔板, 4 $^{\circ}$ C包被过夜。

[0116] 2. 封闭: 洗涤后加入3% NFM于37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0117] 3. 孵育一抗: 洗涤后加入P2特异性抗体 (1:8000稀释) 37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0118] 4. 孵育二抗及检测: 洗涤后加入HRP-羊抗兔IgG抗体 (1:10000稀释)。后续步骤同实施例1。

[0119] 二、多肽PB-TUP-P2与多肽P2对人血管内皮细胞的粘附实验

[0120] 1. 包被: 将70 μ M PB-TUP-P2与P2分别溶解于pH 9.6包被液中, 过滤除菌后加入聚苯乙烯96孔细胞培养微孔板内, 4 $^{\circ}$ C包被过夜。

[0121] 2.封闭:去除包被液并用200μL 1%BSA-TBS于37℃封闭1h。

[0122] 3.细胞黏附:收集培养至80%并已饥饿处理的人脐静脉内皮细胞(HUVECs),用无血清培养基调整细胞数至 2×10^5 个/mL,以100μL每孔接种于已包被封闭处理的聚苯乙烯微孔板中,37℃5%CO₂粘附1.5h。

[0123] 4.洗涤:去除细胞培养基,用PBS轻轻洗涤去除未黏附细胞。

[0124] 5.检测:每孔加入100μL PBS及CCK-8试剂,继续培养4h。检测OD450nm处各孔吸光值并比较细胞粘附情况。

[0125] 实验结果:

[0126] 如图7所示,与多肽P2相比,PB-TUP-P2融合肽同聚苯乙烯材料的结合显著增加;与BSA-P2偶联物相比,融合肽的包被浓度与聚苯乙烯材料的结合呈浓度依赖性。通过图8粘附实验结果,可证明该PB-TUP序列不影响原P2肽黏附HUVECs细胞的生物学功能;同时由于提高了P2的固定效果,因而黏附效果得到进一步提升,可证明该序列保留原多肽P2的空间构象和功能位点。因此可将该PB-TUP肽序列应用于改善多肽及蛋白质类抗原在聚苯乙烯材料表面固定效果。

<110> 中国药科大学

<120> 一种聚苯乙烯亲和肽及其用于改善抗原固定效果的方法

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

[0001]

Val His Trp Asp Phe Arg Gln Trp Trp Gln Pro Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gtg cat tgg gat ttt cgg cag tgg tgg cag cct tct

36

Val His Trp Asp Phe Arg Gln Trp Trp Gln Pro Ser

1 5 10

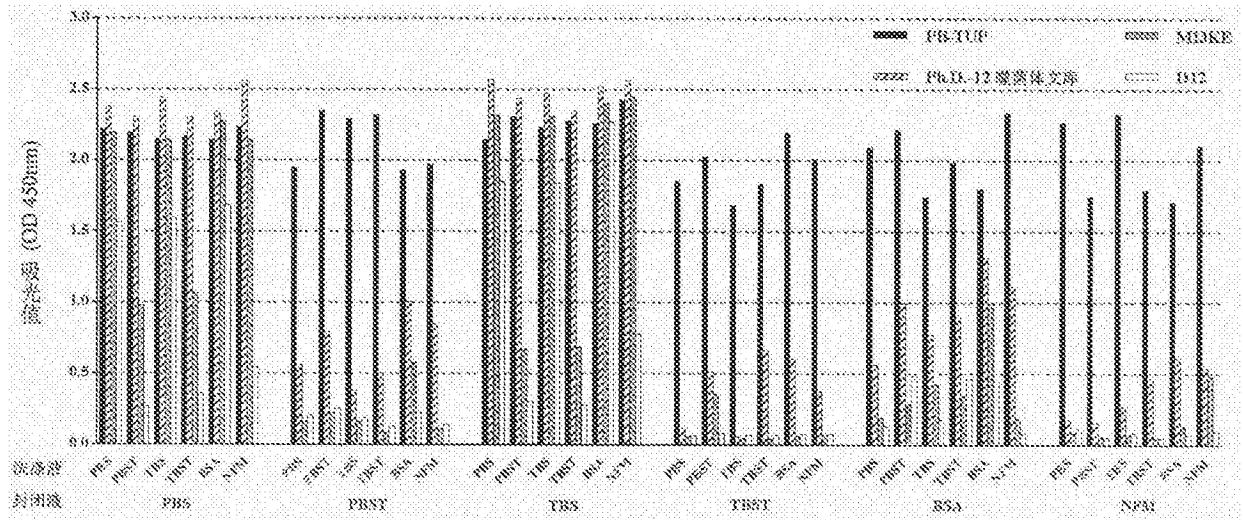


图1

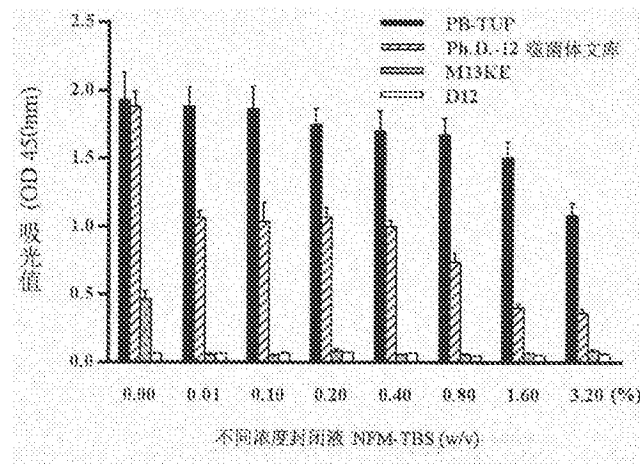


图2

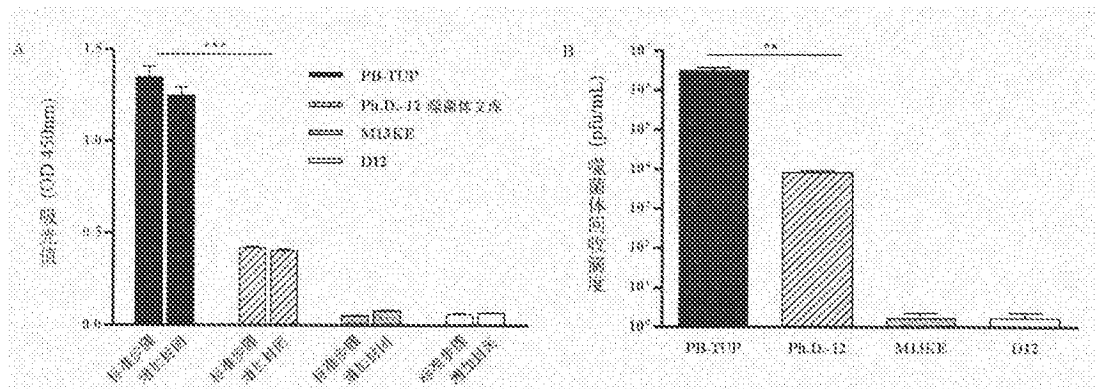


图3

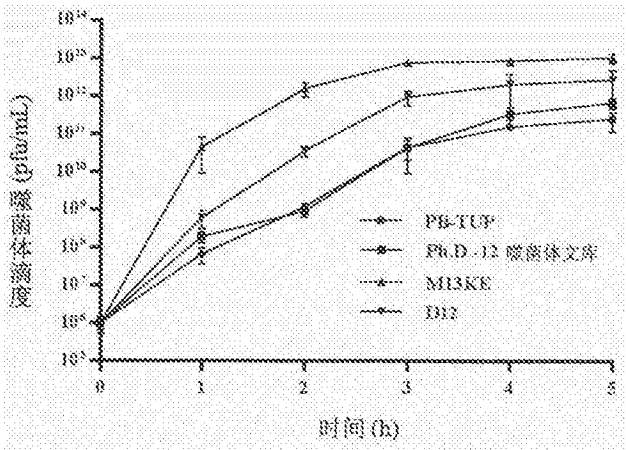


图4

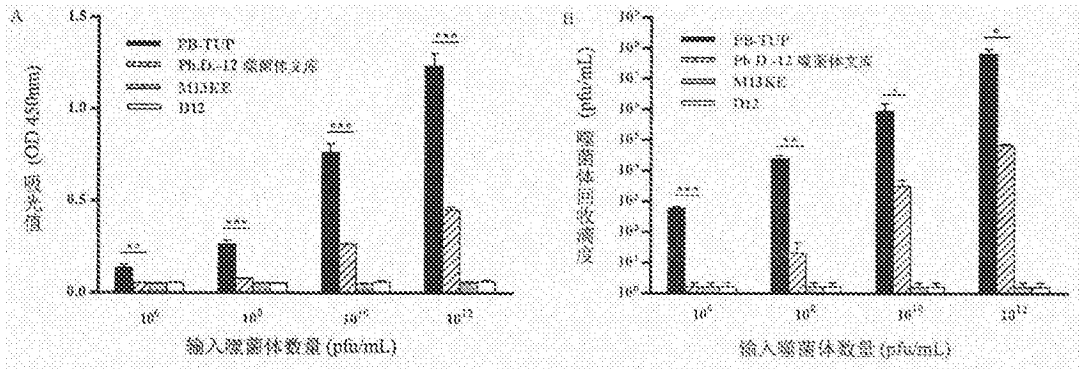


图5

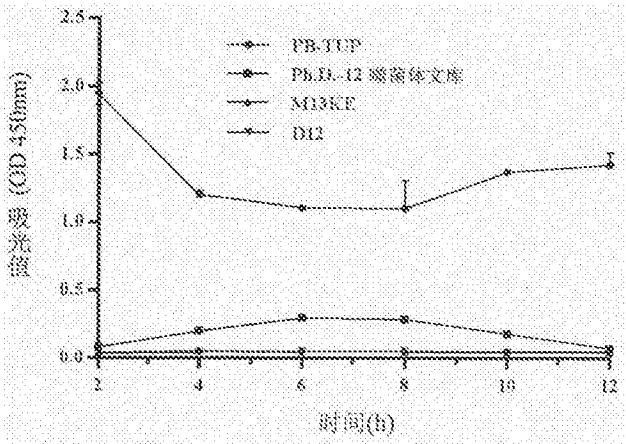


图6

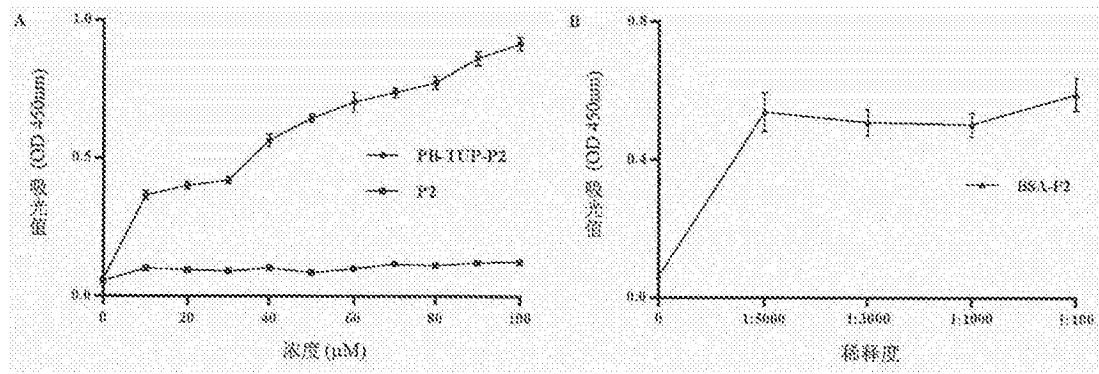


图7

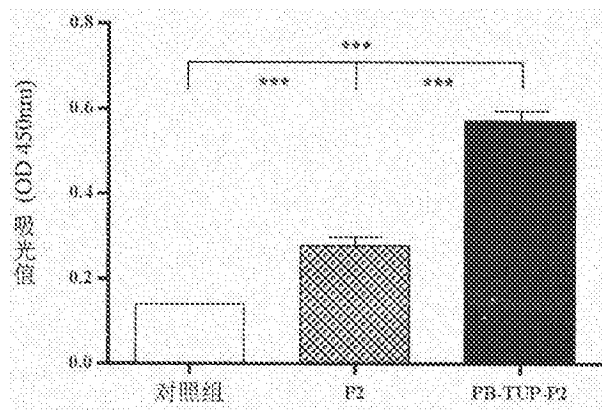


图8

本发明公开了一种能与聚苯乙烯特异性结合的多肽序列及其改善多肽及蛋白质类抗原在聚苯乙烯材料表面固定化的方法。通过噬菌体展示随机肽库筛选,得到一种能与聚苯乙烯亲和结合的多肽PB-TUP,其氨基酸序列为: Val-His-Trp-Asp-Phe-Arg-Gln-Trp-Trp-Gln-Pro-Ser;其编码核苷酸序列为

Figure 1 is a bar chart showing the optical density (OD 450nm) of various bacterial strains on different media (PBST, TBS, TBST, BSA, NFM) under different sealing conditions (PB-TUP, PB-TUP, PB-TUP, PB-TUP, PB-TUP). The chart compares four media: PB-TUP (black bars), PB-TUP (hatched bars), PB-TUP (dotted bars), and PB-TUP (white bars). The y-axis represents OD 450nm, ranging from 0.0 to 2.5. The x-axis shows the media and sealing conditions. The legend indicates: PB-TUP (black bar), PB-TUP (hatched bar), PB-TUP (dotted bar), and PB-TUP (white bar).