



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102121043 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 201010591612. 4

(22) 申请日 2010. 12. 16

(71) 申请人 东华大学

地址 201620 上海市松江区松江新城人民北路 2999 号

(72) 发明人 朱利民 陈天翔 聂华丽 汪雯

(74) 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所 31233

代理人 黄志达 谢文凯

(51) Int. Cl.

C12Q 1/37(2006. 01)

G01N 33/573(2006. 01)

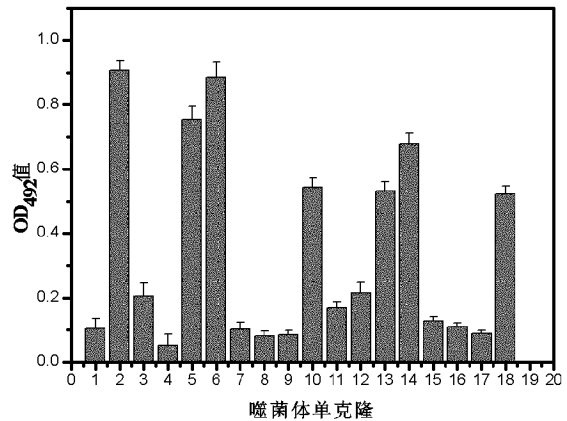
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,包括:(1)生物淘洗;(2)噬菌体定向扩增与富集;(3)滴度测试;(4)单克隆噬菌体扩增;(5)ELISA 测试;(6)DNA 测序, Ile-XXX-Ser-Pro-XXX-XXX-XXX(LXSPXXX)。本发明的制备方法简单,成本低廉,大肠杆菌与噬菌体的生物资源丰富;选出来的对菠萝蛋白酶有亲和作用的 7 肽配基对菠萝蛋白酶有较高的亲和作用,并且能够发现其一致序列,对于蛋白质组学中的蛋白质相互作用提供丰富的实验数据;菠萝蛋白酶高亲和力的 7 肽配基更可用于对菠萝蛋白的分离纯化研究。



1. 一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,包括:

(1) 酶标板包被 100 ~ 300 μ l 菠萝蛋白酶溶液,4 $^{\circ}$ C 轻微震荡,孵育 12-24h,之后冲洗包被液,加满封阻液,0 ~ 4 $^{\circ}$ C 静置 1 ~ 2h,完成后去除封阻液,用 TBST 缓冲液迅速洗酶标板 2 ~ 10 次;噬菌体 7 肽库以 5 ~ 10 倍稀释度加入上述酶标板的酶标孔中,摇动 1 ~ 2h, TBST 缓冲液迅速洗酶标板 2 ~ 10 次,用 50 ~ 100 μ g/ml 游离菠萝蛋白酶分子 TBS 洗脱液竞争性洗脱吸附在固相酶标板上的噬菌体,室温摇动 1 ~ 2h,洗脱下来的噬菌体作滴度测试;

(2) 挑取 ER2738 菌株培养于 LB-Tet 培养液中,25 ~ 37 $^{\circ}$ C 180 ~ 200rpm 振荡培养 12-24h,之后用不加抗生素 Tet 的 LB 培养液 1 : 50 ~ 1 : 100 稀释并再次培养待用,步骤 (1) 噬菌体洗脱液定量加入至上述大肠杆菌菌液中,25 ~ 37 $^{\circ}$ C,60 ~ 100rpm 感染 1 ~ 2h,0 ~ 4 $^{\circ}$ C,离心 10 ~ 20min,去上清,菌体重悬至 100 ~ 200ml LB 培养液中培养 8 ~ 14h,取培养后的菌液 0 ~ 4 $^{\circ}$ C,离心 10 ~ 20min,取上清,加入体积比为 1 : 3 ~ 1 : 6 的聚乙二醇和氯化钠,震荡混匀后冰置 1 ~ 2h,在 0 ~ 4 $^{\circ}$ C,8000 ~ 15000rpm 离心 10 ~ 20min 去上清,沉淀物重悬于 1 ~ 2ml TBS 溶液,再加体积比为 1 : 3 ~ 1 : 6 的聚乙二醇和氯化钠溶液进行再沉淀,冰置 1 ~ 2h 后,0 ~ 4 $^{\circ}$ C,8000 ~ 12000rpm 离心 10 ~ 20min,弃上清,再快速离心移去残余上清液,沉淀重悬于 100 ~ 200 μ l TBS,0.01 ~ 0.02% NaN_3 中,得扩增后的噬菌液;

(3) 将上述扩增后的噬菌液分别用 TBS 缓冲液稀释 10 ~ 10³ 倍,噬菌液加入到大肠杆菌菌液,快速震荡混匀,室温温育 2 ~ 5min,然后将感染的菌液注入 40 ~ 50 $^{\circ}$ C 的顶层琼脂试管中,快速震荡混匀并立即倾注于 25 ~ 37 $^{\circ}$ C 预温的 LB/IPTG/Xgal 平板上,均匀铺开,25 ~ 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12-24h,之后计数平板;

(4) 挑取上述 LB-IPTG/Xgal 平板上蓝色噬菌斑 10 ~ 20 个分别装入上述 1 ~ 2ml ER2738 菌液中,25 ~ 37 $^{\circ}$ C 180 ~ 220rpm 震荡培养 4 ~ 5h,离心后取上清液即得单克隆扩增液;

(5) 100 ~ 300 μ l pH 8.6 菠萝蛋白酶 0 ~ 4 $^{\circ}$ C 包被 12-24h,吸出包被液,加满封阻液,25 ~ 37 $^{\circ}$ C 静置 1 ~ 2h,完成后吸出封闭液,用 TBST 快速洗板 2 ~ 10 次,每孔加入 100 ~ 300 μ l TBST,每排第二孔加入 10 ~ 20 μ l 的单克隆扩增液,并稀释至 12 孔,25 ~ 37 $^{\circ}$ C 缓慢震荡 1 ~ 2h,甩出单克隆扩增液,TBST 洗涤 6 ~ 10 次后,每孔加入 100 ~ 300 μ l 抗 fd 噬菌体生物素复合物,轻轻混匀 20 ~ 30sec,封板后 25 ~ 37 $^{\circ}$ C 温育 1 ~ 2h,TBST 再次洗涤 6 ~ 10 次,每孔加入 100 ~ 300 μ l 抗生物素辣根过氧化物酶复合物,轻轻混匀 20 ~ 30sec,封板,25 ~ 37 $^{\circ}$ C 同样温育 1 ~ 2h,TBST 再次洗板 6 ~ 10 次,每孔加入 100 ~ 300 μ l 邻苯二胺显色液,轻轻混匀 5 ~ 10sec,25 ~ 37 $^{\circ}$ C 暗处显色 0.2 ~ 1h,显色后每孔加入 100 ~ 300 μ l 1 ~ 2M H_2SO_4 终止液,轻轻混匀 20 ~ 30sec;20 ~ 30min 内测 OD 值;

(6) 挑取步骤 (5) 中的 ELISA 阳性单克隆噬菌体以 -96 引物进行测序,解读 7 肽氨基酸排列序列。

2. 根据权利要求 1 所述的一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中的酶标板为 96 孔酶标板。

3. 根据权利要求 1 所述的一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,其特征在于:所述步骤 (2) 中洗脱下来的噬菌液 5 ~ 10 μ l 用作滴度测试,待用的宿主大肠杆菌 ER2738

的菌种浓度为 $OD_{A_{600}} = 0.2 \sim 0.5$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,其特征在於:所述步骤 (2) 中的噬菌体扩增计算的有效值为每个平板含有噬菌斑 1 ~ 100 个。

5. 根据权利要求 1 所述的一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,其特征在於:所述步骤 (3) 中的滴度测试中,噬菌液体积为 5 ~ 10 μ l,大肠杆菌 ER2738 的体积为 100 ~ 200 μ l。

6. 根据权利要求 1 所述的一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,其特征在於:所述步骤 (4) 中离心后取上清液,再次短暂离心 10 ~ 30sec,取 60 ~ 80% 上清液,即为单克隆噬菌体扩增液。

7. 根据权利要求 1 所述的一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,其特征在於:所述步骤 (5) 中的 ELISA 测试用酶联免疫检测仪在 OD 492nm 处测定。

一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法

技术领域

[0001] 本发明属亲和配基筛选方法领域,特别是涉及一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法。

背景技术

[0002] 目前,亲和色谱技术已经愈发成熟,也更多的运用到生产实践中去,但同时,也遇到了相应的瓶颈问题。随着生物学技术的快速发展和壮大,市场上对于高纯度的生物大分子的需求也是越来越大,然后落后的传统色谱技术不能完全跟上市场的需求:分离成本大,纯化时间长,操作工序繁琐等问题一直困扰着色谱领域的科学家。

[0003] 如何找到一个合适的配基,能够一对一单独吸附一种生物大分子比如某种蛋白质或者酶,这是目前色谱领域亟待解决的一个难题。近十几年来,由于化学上的组合化学技术和生物学上的高通量生物筛选技术的蓬勃发展,仿生配基的研究也应运而生,研究者们设法变被动为主动,从以前的盲目通过试误法一个个筛选寻找目标蛋白配基的方法逐渐向利用高通量技术随机寻找仿生配基来替代以前的三嗪染料配基和金属螯合物配基。例如已经有研究者利用组合筛选方法,通过大量试验与淘洗,筛选出小分子仿生配基作为目标蛋白的亲和配基。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,该方法简单,成本低廉,大肠杆菌与噬菌体的生物资源丰富;选出来的对菠萝蛋白酶有亲和作用的7肽配基对菠萝蛋白酶有较高的亲和作用,并且能够发现其一致序列,对于蛋白质组学中的蛋白质互相作用提供丰富的实验数据。

[0005] 本发明的一种亲和筛选菠萝蛋白酶的亲和配基的方法,包括:

[0006] (1) 生物淘洗(筛选):酶标板包被 $100 \sim 300 \mu\text{l}$ 菠萝蛋白酶溶液, 4°C 轻微震荡,孵育 12-24h,之后冲洗包被液,加满封阻液, $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 静置 1 ~ 2h,完成后去除封阻液,用 TBST 缓冲液迅速洗酶标板 2 ~ 10 次;噬菌体 7 肽库以 5 ~ 10 倍稀释度加入所述酶标板的酶标孔中,摇动 1 ~ 2h, TBST 缓冲液迅速洗酶标板 2 ~ 10 次,用 $50 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 游离菠萝蛋白酶分子 TBS 洗脱液竞争性洗脱吸附在固相酶标板上的噬菌体,室温摇动 1 ~ 2h,洗脱下来的噬菌体作滴度测试;

[0007] (2) 噬菌体定向扩增与富集:挑取 ER2738 菌株培养于 LB-Tet 培养液中, $25 \sim 37^\circ\text{C}$ $180 \sim 200\text{rpm}$ 振荡培养过夜,次日用 LB 培养液(不加抗生素 Tet) 1 : 50 ~ 1 : 100 稀释并再次培养待用,步骤(1)噬菌体洗脱液定量加入至上述大肠杆菌菌液中, $25 \sim 37^\circ\text{C}$, $60 \sim 100\text{rpm}$ 感染 1 ~ 2h, $0 \sim 4^\circ\text{C}$,离心 10 ~ 20min,去上清,菌体重悬至 $100 \sim 200\text{ml}$ LB 培养液中培养 8 ~ 14h,取培养后的菌液 $0 \sim 4^\circ\text{C}$,离心 10 ~ 20min,取上清,加入体积比为 1 : 3 ~ 1 : 6 的聚乙二醇和氯化钠,震荡混匀后冰置 1 ~ 2h,在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$, $8000 \sim 15000\text{rpm}$ 离心 10 ~ 20min 去上清,沉淀物重悬于 1 ~ 2ml TBS 溶液,再加体积比为 1 : 3 ~ 1 : 6 的

聚乙二醇和氯化钠溶液进行再沉淀,冰置 1 ~ 2h 后,0 ~ 4℃,8000 ~ 12000rpm 离心 10 ~ 20min,弃上清,再快速离心移去残余上清液,沉淀重悬于 100 ~ 200 μ l TBS,0.01 ~ 0.02% NaN_3 中,得扩增后的噬菌液;

[0008] (3) 滴度测试:将上述扩增后的噬菌液分别用 TBS 缓冲液稀释 10 ~ 10^3 倍,噬菌液加入到大肠杆菌菌液,快速震荡混匀,室温温育 2 ~ 5min,然后将感染的菌液注入 40 ~ 50℃的顶层琼脂试管中,快速震荡混匀并立即倾注于 25 ~ 37℃预温的 LB/IPTG/Xgal 平板上,均匀铺开,25 ~ 37℃倒置培养 12-24h,之后计数平板;

[0009] (4) 单克隆噬菌体扩增:挑取上述 LB-IPTG/Xgal 平板上蓝色噬菌斑 10 ~ 20 个分别装入上述 1 ~ 2ml ER2738 菌液中 ($\text{OD}_{A_{600}} = 0.2 \sim 0.5$),25 ~ 37℃ 180 ~ 220rpm 震荡培养 4 ~ 5h,离心后取上清液即得单克隆扩增液;

[0010] (5) ELISA 测试:100 ~ 300 μ l pH 8.6 菠萝蛋白酶 0 ~ 4℃包被 12-24h,吸出包被液,加满封阻液,25 ~ 37℃静置 1 ~ 2h,完成后吸出封闭液,用 TBST 快速洗板 2 ~ 10 次,每孔加入 100 ~ 300 μ l TBST,每排第二孔加入 10 ~ 20 μ l 的单克隆扩增液,并稀释至 12 孔,25 ~ 37℃缓慢震荡 1 ~ 2h,甩出单克隆扩增液, TBST 洗涤 6 ~ 10 次后,每孔加入 100 ~ 300ul 抗 fd 噬菌体生物素复合物 (Anti-fd-Biotin),轻轻混匀 20 ~ 30sec,封板后 25 ~ 37℃温育 1 ~ 2h, TBST 再次洗涤 6 ~ 10 次,每孔加入 100 ~ 300ul 抗生物素辣根过氧化物酶复合物 (EXTRAVIDIN-PEROXIDASE),轻轻混匀 20 ~ 30sec,封板,25 ~ 37℃同样温育 1 ~ 2h, TBST 再次洗板 6 ~ 10 次,每孔加入 100 ~ 300ul 邻苯二胺 (OPD) 显色液,轻轻混匀 5 ~ 10sec,25 ~ 37℃暗处显色 0.2 ~ 1h,显色后每孔加入 100 ~ 300 μ l 1 ~ 2M H_2SO_4 终止液,轻轻混匀 20 ~ 30sec;20 ~ 30min 内测 OD 值;

[0011] (6) DNA 测序:挑取 ELISA 阳性单克隆噬菌体以 -96 引物进行测序,解读 7 肽氨基酸排列序列。

[0012] 所述步骤 (1) 中的酶标板为 96 孔酶标板。

[0013] 所述步骤 (2) 中洗脱下来的噬菌液 5 ~ 10 μ l 用作滴度测试,待用的宿主大肠杆菌 ER2738 的菌种浓度为 $\text{OD}_{A_{600}} = 0.2 \sim 0.5$ 。

[0014] 所述步骤 (2) 中的噬菌体扩增计算的有效值为每个平板含有噬菌斑 1 ~ 100 个。

[0015] 所述步骤 (3) 中的滴度测试中,噬菌液体积为 5 ~ 10 μ l,大肠杆菌 ER2738 的体积为 100 ~ 200 μ l。

[0016] 所述步骤 (4) 中离心后取上清液后,再次短暂离心 10 ~ 30sec,取 60 ~ 80% 上清液,即为单克隆噬菌体扩增液。

[0017] 所述步骤 (5) 中的 ELISA 测试用酶联免疫检测仪在 OD 492nm 处测定。

[0018] 有益效果

[0019] (1) 本发明的制备方法简单,成本低廉,大肠杆菌与噬菌体的生物资源丰富;

[0020] (2) 所筛选出来的对菠萝蛋白酶有亲和作用的 7 肽配基对菠萝蛋白酶有较高的亲和作用,并且能够发现其一致序列,对于蛋白质组学中的蛋白质互相作用提供丰富的实验数据;

[0021] (3) 对菠萝蛋白酶高亲和力的 7 肽配基更可用于对菠萝蛋白的分离纯化研究。

附图说明

- [0022] 图 1 是大肠杆菌的生长曲线与菌体含量图；
[0023] 图 2 是靶分子（菠萝蛋白酶）浓度的选择优化；
[0024] 图 3 是去污剂浓度的选择优化；
[0025] 图 4 是噬菌体第四轮淘洗的噬菌斑；
[0026] 图 5 四轮淘洗中噬菌体回收量及回收率；
[0027] 图 6 是 18 个噬菌体单克隆阳性克隆的 ELISA 检测。

具体实施方式

[0028] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0029] 实施例 1

[0030] 噬菌体宿主菌 ER2738 的培养与生长曲线测定，具体步骤如下：

[0031] 图 1 所示：在接种至液体培养基 2.5h 后，大肠杆菌度过了迟缓期，进入对数期，在大约培养 3-3.5h，OD_{A600} 达到 0.5，从图示中我们发现大肠杆菌 ER2738 菌群开始进入对数前期，OD 值上升速度极快，这个培养时间 3.5h 和大多数研究者经验所得所需要花费的时间是一致的。说明一般挑取单菌落液体培养或者稀释后一般 3.5h 进行噬菌体感染是最适合的。

[0032] 实施例 2

[0033] M13 丝状噬菌体的扩增，具体步骤如下：

[0034] (1) 挑取 ER2738 菌株培养于 LB-Tet 培养液中，37℃ 200rpm 振荡培养过夜，次日 1 : 100 稀释的培养液使用 LB 培养液（不加抗生素 Tet）摇床至 OD_{A600} = 0.5 待用。

[0035] (2) 噬菌体洗脱液定量加入至 LB 菌液中，37℃，85rpm 感染 1h。4℃，5000rpm 离心 15min。去上清，菌体重悬至 200ml LB 培养液（注：此处 LB 培养液不加抗生素，增加噬菌体感染力和活力）中培养 12h。

[0036] (3) 次日取菌液 4℃，5000rpm 离心 15min，取上清，转入新鲜离心管后加入 1/5 (V/V) PEG/NaCl，震荡混匀后冰置 1h。4℃，12000rpm 离心 20min 去上清，沉淀物重悬于 1ml TBS 溶液，转入微量离心管，再加 1/5 (V/V) PEG/NaCl 溶液进行再沉淀，冰置 1h 后，4℃，12000rpm 离心 20min，弃上清，再快速离心移去残余上清液。沉淀重悬于 200 μl TBS，0.02% NaN₃ 中。

[0037] 实验结果如表 1 显示：第一种扩增方法是由于 NEB 公司设计的扩增方法时间段，只有 4.5h，但是它大大降低了序列偏嗜现象。第二种方法是本发明自行设计，在保证大肠杆菌 ER2738 在 12h 内完成生长曲线的期限内，立刻停止扩增，这样也能降低序列偏嗜现象，但同时保证噬菌体增殖完成一定的数量级。由于感染时间长于方法 1，因此得到了更好的扩增效果。

[0038] 实施例 3

[0039] 对生物淘洗方法条件优化，具体步骤如下：

[0040] (1) 靶分子浓度选择优化：

[0041] 设计同时进行四个平行淘洗过程，以 BSA 作为靶分子溶液，温育酶标板的浓度分

别为 100 μ g/ml, 80 μ g/ml, 50 μ g/ml, 20 μ g/ml。随机挑取每个淘洗筛选出来的噬菌体 10 个, 对其进行 ELISA 检测, 如图 2 所示: 整体上可以发现浓度最低的 20 μ g/ml 的靶分子浓度所筛选的 OD 值普遍偏高, 预示着低浓度靶分子溶液包被的酶标板所筛选出来的配基亲和性相对来说更高。

[0042] 因此设计在淘洗菠萝蛋白酶的四轮淘洗过程中, 逐级降低菠萝蛋白酶溶液的浓度, 从 100 μ g/ml, 80 μ g/ml, 50 μ g/ml, 20 μ g/ml 依次进行筛选。

[0043] (2) 去污剂浓度选择优化:

[0044] 在淘洗过程中去污剂洗涤清洗酶标孔 (本实验为 TBS-Tween-20), 只有逐渐增强去污剂的浓度, 又不超出其限度, 才能筛选出理想的配基来。结果如图 3 所示: 去污剂浓度达到 1.0% 时候, 洗脱力太强, 导致筛选结果不理想, 浓度 0.05% 的洗脱力不够, 导致不能屏蔽非特异性吸附带来的假阳性结果。因此本实验选择不同浓度的去污剂浓度 0.5%, 0.2%, 0.1% 分别对应第三 / 四, 第二和第一轮。

[0045] (3) 洗脱方法选择优化:

[0046] 一般洗脱法分为非特异性洗脱法和特异性竞争性洗脱法两种。本实验采用非特异性洗脱法 0.2M Glycine-HCl (pH 2.2), 1mg/ml BSA 作为洗脱剂, 以及特异性洗脱剂 100 μ g/ml 游离菠萝蛋白酶分子 TBS 洗脱剂, 对每次生物淘洗后的酶标孔进行洗脱, 结果如表 2 所示: 洗脱的效果几乎持平, 但是考虑到酸性洗脱法的低 pH 值会使噬菌体的感染系数降低, 通常洗脱时间不能超过 10min, 否则噬菌体将失去感染能力。另外, 短时间的洗脱, 只能筛选到亲和力底下, 解离常数小 k 的短肽配基。因此, 综合考虑下, 本文选取特异性洗脱剂对以下实验进行洗脱。

[0047] 实施例 4

[0048] 生物淘洗对菠萝蛋白酶的亲和 7 肽配基, 具体步骤如下:

[0049] (1) 噬菌体 7 肽库筛选 96 孔酶标板包被 300 μ l 将 100 μ g/ml 的菠萝蛋白酶精酶 0.1MNaHCO₃ 溶液 (pH 8.6), 旋转酶标板湿润整个板孔。将酶标板置于增湿容器中 4℃ 轻微震荡, 孵育过夜。挑 ER2738 单克隆菌种于 20ml LB-Tet 液体培养液 (250ml 锥形瓶, 以增加氧气量) 中, 37℃, 200rpm 震荡培养。

[0050] (2) 次日冲洗包被液, 加满封阻液, 4℃ 静置 1h。完成后去封阻液, 用 TBST (0.1% [v/v] 第一轮, 0.2% [v/v] 第二轮, 0.5% [v/v] 第三四轮) 缓冲液迅速洗板 6 次。100 μ l TBST 缓冲液稀释 10¹² 数量级数的噬菌体量, 以 10 倍稀释度一直稀释到酶标板每排的 11 个孔 (每排第一个孔为空白液), 室温温和摇动 1h。倾倒除去未结合噬菌体后, TBST 缓冲液迅速洗板 10 次。

[0051] (3) 洗脱为特异性洗脱, 即 100 μ g/ml 游离菠萝蛋白酶分子 TBS 洗脱液竞争性洗脱吸附在固相酶标板上的噬菌体。室温温和摇动 1h。洗脱下来的噬菌体可作滴度测试。

[0052] 结果如图 4 和图 5 显示: 图 4 是四轮筛选第四轮中对菠萝蛋白酶有亲和作用的噬菌体单克隆扩增后的滴度测试, 从图中可以发现, 由于文库噬菌体源于常规克隆载体 M13mp19, 其含有 lacZ α 基因, 当铺在含 IPTG 和 X-gal 的平板上时, 噬菌斑将呈现蓝色, 说明实验结果良好。

[0053] 图 5 则是四轮淘洗过程中噬菌体回收量和回收率的图谱。实验结果显示此法筛选克服了传统筛选流程富集程度不高的缺点: 第二轮的噬菌体回收率比第一轮高出 13.77

倍,而第三轮的回收率比之第一轮高出可以发现 153.06 倍,第四轮的回收率有所降低,说明了富集已经到了临界点。因此本实验共选择 4 轮淘洗过程,选择阳性单克隆进行 ELISA 测试。

[0054] 实施例 5

[0055] 随机挑选第四轮淘洗中的噬菌体单克隆 18 个进行 ELISA,具体步骤如下:

[0056] (1) 首先将目标蛋白菠萝蛋白酶包被在酶标板的微孔固相上;

[0057] (2) 混合第四轮中随机挑取的 18 个单克隆噬菌体,使单克隆噬菌体展示的 7 肽与目标蛋白进行亲和作用;

[0058] (3) 第三步加入 Anti-fd-Biotin(SIGMA),此类抗体能够对 fd 和 M13 噬菌体有抗原反应,并且链接生物素;

[0059] (4) 第四步加入 EXTRAVIDIN-PEROXIDASE(SIGMA),此二抗的抗生物素蛋白能够特异性的与生物素结合,酶标抗体上的酶是辣根过氧化物酶(HRP);

[0060] (5) 最后加入 HRP 底物 OPD 溶液。在 492nm 波长处测定底物含量的变化。

[0061] 结果如图 6 所示:以上的 18 个单克隆噬菌体中其中 2#,5#,6# 在 492nm 处有强烈吸收峰。其中 6# 的 OD 值达到了 1.9,证明底物 OPD 被大量 HRP 所催化,也就意味着这三个单克隆所展示的 7 肽对菠萝蛋白酶的亲和作用较高。可以对 2#,5#,6#,10#,14#,18#6 个阳性克隆进行 DNA/氨基酸测序。

[0062] 实施例 6

[0063] 6 个阳性克隆的 DNA 测序:

[0064] 挑取 ELISA6 个阳性单克隆噬菌体以 -96 引物进行测序,解读 7 肽氨基酸排列序列。结果如表 3 所示:6 个阳性克隆的氨基酸序列有共同的一致序列 Ile-XXX-Ser-Pro-XX X-XXX-XXX(LXSPXXX)。

[0065] 表 1 不同扩增方法的选择优化

	扩增方法	噬菌体投入量 (cfu)	噬菌体洗脱量 (cfu)	扩增倍数
[0066]	1	10^3	6.7×10^8	$\approx 10^5$
	2	10^3	5.3×10^{11}	$\approx 10^9$

[0067] 表 2 洗脱方法的选择优化

	洗脱方法	噬菌体投入量(cfu)	噬菌体洗脱量(cfu)
[0068]	1	10^3	355
	2	10^3	478

[0069] 表 3 菠萝蛋白酶高亲和性的 7 肽氨基酸序列展示

[0070]

单克隆	第三轮	第四轮
1	EASPSSP	EQSPHSA
2	EGSPMCS	EASPGAC
3	ENSAPKP	EPSCKLP
4	IPSPLNF	EGSPRSN
5	IGSPPSR	EVSCRVP
6	EHSPKGR	VNSPYKF

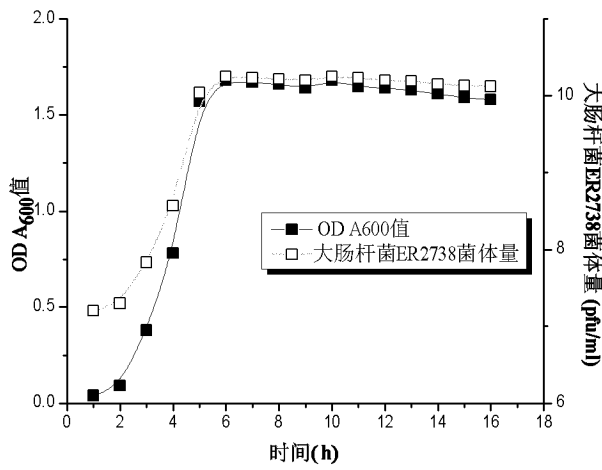


图 1

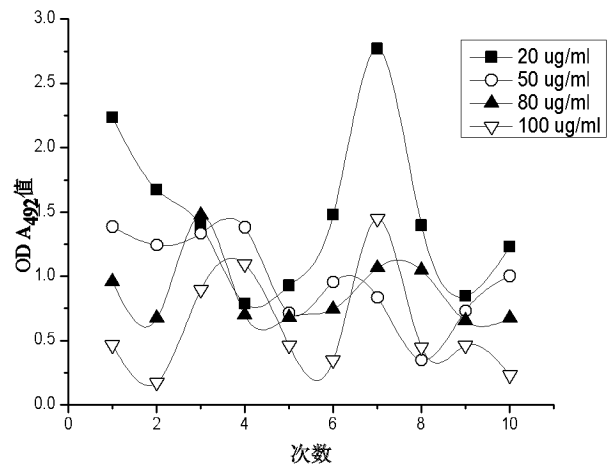


图 2

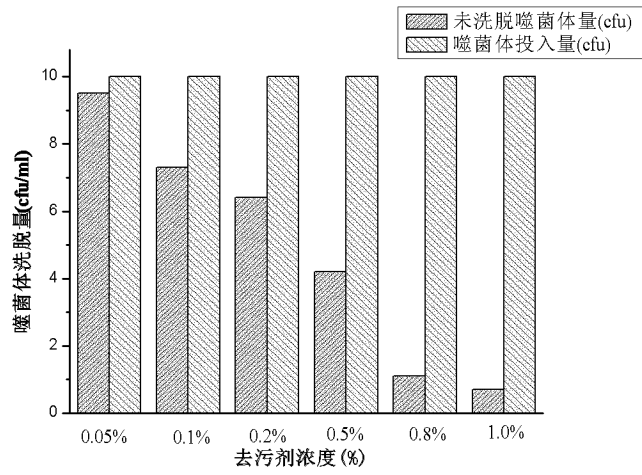


图 3

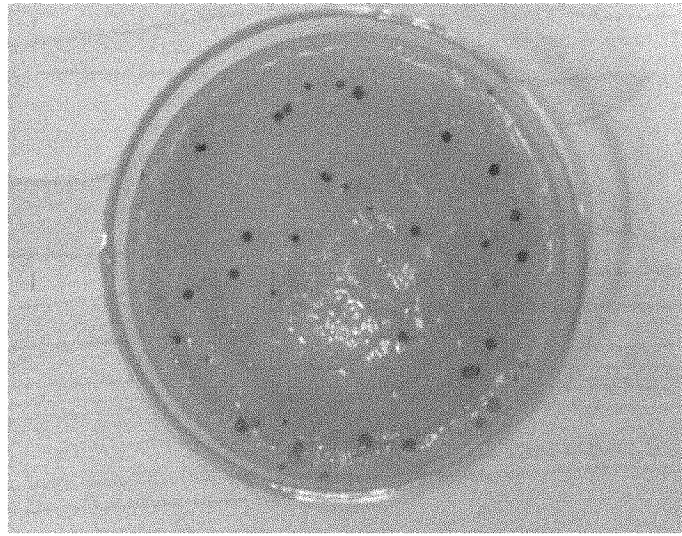


图 4

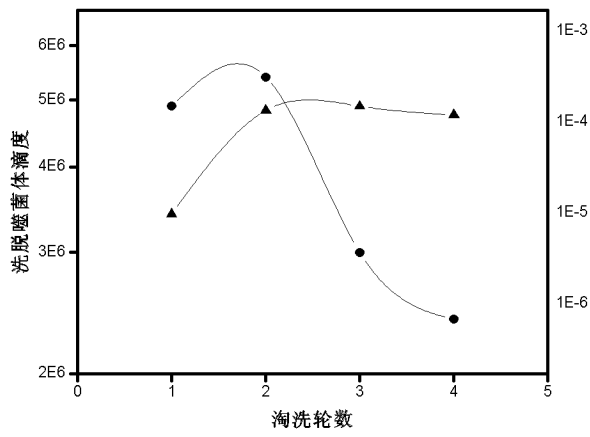


图 5

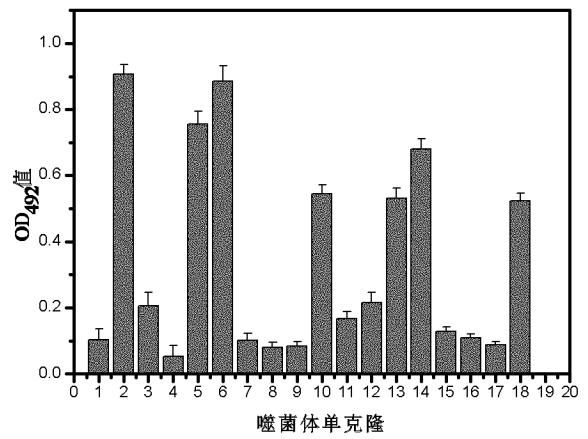


图 6