



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106589061 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(21)申请号 201611108005.1

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2016.12.06

(71)申请人 中国人民解放军南京军区福州总医院

地址 350025 福建省福州市鼓楼区西二环北路156号

(72)发明人 刘宽灿 谢富安 林宝顺 张蕊
肖章武 胡琮 洪笑迁

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊 陈彩芳

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C07K 7/08(2006.01)

G01N 33/539(2006.01)

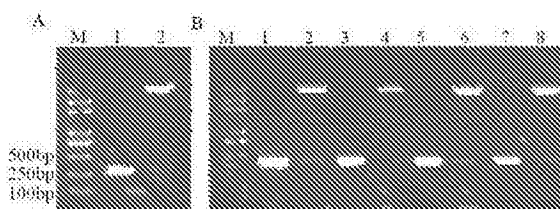
权利要求书1页 说明书8页
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

Sox2-CDP结合结构域的候选肽适配子

(57)摘要

本发明提供Sox2-CDP结合结构域的候选肽适配子,所述肽适配子序列为:P8:LNLFTFRLKICV,利用双分子荧光互补和免疫共沉淀技术进行特异肽适配子的鉴定方法,通过功能分析,我们从中筛选获得了Sox2-CDP结合结构域的有效肽适配子候选药物。本发明获得的肽适配子亲和性高、特异性强,具有显著的肿瘤抑制功能,因此,本发明极具应用价值。



1. Sox2-CDP结合结构域的候选肽适配子,其特征在于:所述肽适配子序列为:P8: LNLFTFRLKICV。

2. 一种如权利要求1所述的Sox2-CDP结合结构域肽适配子鉴定方法,其特征在于:利用双分子荧光互补的肽适配子文库,以pBiFcVN173-CDP Δ C (101-1516) 为靶标,筛选获得靶向结合结构域CDP Δ C (101-1516) 的候选肽适配子;通过表达载体构建、免疫共沉淀技术和细胞功能实验,从候选肽适配子中鉴定能特异高亲和结合结构域CDP Δ C (101-1516) 的肽适配子。

3. 根据权利要求2所述的Sox2-CDP结合结构域肽适配子鉴定方法,其特征在于: pBiFcVN173-CDP Δ C (101-1516) 的制备方法为:利用克隆技术和载体构建技术,将经过高保真PCR和酶切获得的具有特定黏性末端的CDP Δ C (101-1516) 开放阅读框定向插入至pBiFc-VN173中,获得pBiFcVN173-CDP Δ C (101-1516) 表达载体。

4. 根据权利要求2所述的Sox2-CDP结合结构域肽适配子鉴定方法,其特征在于:所述的靶向结合结构域CDP Δ C (101-1516) 的候选肽适配子,统称为TrxA-peptide-TrxA, peptide指以下4个包含11个氨基酸的短肽,具体序列为TrxA-LNLFTFRLKICV-TrxA, TrxA-LFYIYFSFWFL-TrxA, TrxA-TPVFLPPFSPM -TrxA, TrxA- YLFAIYSFSSL -TrxA,通过位于TrxA中的半胱氨酸形成二硫键,以形成固定的构象,肽适配子位于TrxA表达框中。

5. 根据权利要求2所述的Sox2-CDP结合结构域肽适配子鉴定方法,其特征在于:具体包括以下步骤:

1) 应用设计引物,以双分子荧光互补获取的候选肽适配子pBiFc-VC155-TrxA-peptide-TrxA为模板,对TrxA-peptide-TrxA进行高保真PCR扩增;

2) 通过随机挑选方法,从肽适配子文库中随机挑取30个肽适配子表达载体与pBiFcVN173-CDP Δ C (101-1516) 共转染HEK293T细胞,并观察荧光的出现;

3) 利用酶切连接方法将候选肽适配子TrxA-peptide-TrxA转移入pCMV-Tag2B表达载体,获得pCMV-Tag2B-peptide表达载体;

4) 利用酶切连接方法将CDP Δ C (101-1516) 转移入pBiFcVC155表达载体,获得pBiFcVC155- CDP Δ C (101-1516) 表达载体;

5) 利用共转染方法,以分组形式分别将pCMV-Tag2B-peptide和pBiFcVC155- CDP Δ C (101-1516) 转染入HEK293T 细胞,利用Flag抗体进行免疫共沉淀并联合利用CDP抗体鉴定。

Sox2-CDP结合结构域的候选肽适配子

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及Sox2-CDP结合结构域的候选肽适配子。

背景技术

[0002] 双分子荧光互补技术是一种直观、快速判断目标蛋白在活细胞中定位和相互作用的技术,该技术巧妙地将荧光蛋白分子的两个互补片段分别与目标蛋白融合表达。如果荧光蛋白活性恢复,则表明两目标蛋白发生了相互作用。该技术已用于不同蛋白间相互作用强弱的比较以及蛋白质泛素化等方面的研究工作。肽适配子是指从随机蛋白表达文库中筛选针对蛋白质靶标的短肽分子,这些从高容量的文库中筛选获取的短肽分子能特异地与靶标结合,从而影响靶标的功能,可应用于靶标及其复合物功能的干预研究。

[0003] Sox2蛋白是一个强大的转录因子,在干细胞干性维持和自我更新、多个肿瘤的恶性进程(如肿瘤发生、肿瘤细胞增殖,迁移,侵袭转移,肿瘤干细胞特性维持、化疗药物抗性等的多个方面具有促进作用。CDP蛋白在促进肿瘤功能方面和Sox2蛋白有重叠,而且Sox2与CDP蛋白具有共同的下游表达分子,研究表明,Sox2与CDP能形成蛋白复合物,我们也已经证明在Sox2-CDP复合物中,位于CDP上的结合结构域CDP Δ C(101-1516)。

[0004] 免疫共沉淀技术是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础,用于蛋白质之间相互作用研究的经典方法。该技术基于在溶液状态下或细胞中,蛋白X如能和蛋白Y相互作用,该复合物能被其中任一蛋白的抗体结合发生沉淀的原理,已被广泛用于蛋白质之间相互作用的鉴定实验。

[0005] 肿瘤细胞增殖实验主要包括细胞计数和克隆形成实验,其中克隆形成实验是用来检测细胞克隆形成的能力。细胞接种后的存活率只表示接种细胞后贴壁的细胞数,但贴壁后的细胞不一定每个都能增殖和形成克隆。而形成克隆的细胞必须具备贴壁和增殖活力。克隆形成率反映了细胞群体依赖性和增殖能力两个重要性状。并且克隆形成率与接种密度有一定关系。

[0006] 肿瘤细胞侵袭实验是一个模拟体内环境,依赖肿瘤细胞分泌蛋白酶降解基质,从而使细胞具备转移能力的能力测试,它从一定程度反映了细胞的侵袭和转移潜能。目前多应用Transwell小室和Matrigel基质胶完成实验。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供Sox2-CDP结合结构域的候选肽适配子,利用双分子荧光互补和免疫共沉淀技术进行特异肽适配子的鉴定方法,通过功能分析,我们从中筛选获得了Sox2-CDP结合结构域的有效肽适配子候选药物。

[0008] Sox2-CDP结合结构域肽适配子,序列为:LNLFTFRLKICV。利用基于双分子荧光互补技术建立的肽适配子文库(构建方法见专利201410339641.X),以pBiFcVN173-CDP Δ C(101-1516)为靶标,筛选获得靶向结合CDP Δ C(101-1516)的候选肽适配子;通过表达载体构建和免疫共沉淀技术,从候选肽适配子中鉴定能特异高亲和结合CDP Δ C(101-1516)的肽适配

子。CDP Δ C(101-1516)结构域序列为：MAANVGSMFYWKRFDLQQLQRELDATATVLANRQDESESRKRLIEQSREFKKNTPEDLRKQVAPLLKSFQGEIDALSKRSKEAAFLNVYKRLIDVP。

[0009] pBiFcVN173-CDP Δ C(101-1516)的制备方法为：利用克隆技术和载体构建技术，将经过高保真PCR和酶切获得的具有特定黏性末端的CDP Δ C(101-1516)开放阅读框定向插入至pBiFc-VN173中，获得pBiFcVN173-CDP Δ C(101-1516)表达载体。

[0010] 所述的靶向结合CDP Δ C(101-1516)的候选肽适配子，统称为TrxA-peptide-TrxA，peptide指以下4个包含11个氨基酸的短肽，具体序列为TrxA-LNLFTFRLKICV-TrxA，TrxA-LFYIYFSFWFL-TrxA，TrxA-TPVFLPPFSPM-TrxA，TrxA-YLFAIYSFSSL-TrxA，通过位于TrxA中的半胱氨酸形成二硫键，以形成固定的构象，特异短肽位于TrxA表达框中。

[0011] Sox2-CDP结合结构域的肽适配子鉴定方法，包括以下步骤：

1) 应用设计引物，对CDP Δ C(101-1516)进行高保真扩增后，进行EcoRI和XbaI双酶切后转移入pBiFcVN173表达载体，获得pBiFcVN173-CDP Δ C(101-1516)表达载体；

2) 通过随机挑选方法，从肽适配子文库(专利号：ZL201410339641.X)中随机挑取30个肽适配子表达载体与pBiFcVN173-CDP Δ C(101-1516)共转染HEK293T细胞，同时转染pDsRED2-C1作为内参，观察荧光的出现；

3) 应用设计引物，以双分子荧光互补获取的候选肽适配子pBiFcVC155-TrxA-peptide-TrxA为模板，对TrxA-peptide-TrxA进行高保真PCR扩增；

4) 利用酶切连接方法将候选肽适配子TrxA-peptide-TrxA转移入pCMV-Tag2B表达载体，获得pCMV-Tag2B-TrxA-peptide-TrxA表达载体；

5) 利用酶切连接方法将CDP Δ C(101-1516)转移入pBiFcVC155表达载体，获得pBiFcVC155-CDP Δ C(101-1516)表达载体；

6) 利用共转染方法，以分组形式分别将pCMV-Tag2B-TrxA-peptide-TrxA和pBiFcVC155-CDP Δ C(101-1516)转染入HEK293T细胞，利用Flag抗体进行免疫共沉淀并联合利用CDP抗体鉴定；

利用克隆技术和载体构建技术，将经过高保真PCR和酶切获得的具有特定黏性末端的CDP Δ C(101-1516)开放阅读框定向插入至pBiFc-VN173中，获得pBiFcVN173-CDP Δ C(101-1516)表达载体。

[0012] 根据双分子荧光互补技术，从肽适配子文库中筛选获得了4个候选肽适配子：P8：LNLFTFRLKICV、P32：LFYIYFSFWFL、P46：TPVFLPPFSPM和P58：YLFAIYSFSSL，这些肽适配子插入于TrxA支架中，并与VENUS蛋白C155片段融合表达。

[0013] 利用克隆技术和载体构建技术，将经过高保真PCR和酶切获得的具有特定黏性末端的TrxA-peptide-TrxA候选肽适配子核苷酸片段定向插入至pCMV-Tag2B表达载体，获得pCMV-Tag2B-TrxA-peptide-TrxA表达载体。

[0014] 利用克隆技术和载体构建技术，将经过高保真PCR和酶切获得的具有特定黏性末端的CDP Δ C(101-1516)开放阅读框定向插入至pBiFcVC155表达载体，获得pBiFcVC155-CDP Δ C(101-1516)表达载体。

[0015] 利用克隆技术和载体构建技术，将经过高保真PCR和酶切获得的具有特定黏性末端的TrxA-peptide-TrxA候选肽适配子核苷酸片段定向插入至PCDH-CMV-MCS-IRES-GFP-

EF1-Puro表达载体,获得构建PCDH-CMV-TrxA-peptide- TrxA-IRES-GFP-EF1-Puro表达载体。

[0016] PCDH-CMV-MCS-IRES-GFP-EF1-Puro表达载体的制备方法为设计引物,利用高保真克隆方法获取IRES-GFP,并将IRES-GFP定向插PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro慢病毒载体中,获得PCDH-CMV-MCS-IRES-GFP-EF1-Puro。

[0017] 另外,ΔN、ΔC为通用指的是删除N端和C端,Δ指的是删除(delete)的意思,如SOX2 ΔN(1-167)指的是删除N端1-167氨基酸位点的截短SOX2蛋白。

[0018] 将所有目的质粒抽提后送测序公司测序并确认序列的正确性和一致性。

[0019] 将所有慢病毒表达载体PCDH-CMV-TrxA-peptide-TrxA-IRES-GFP-EF1-Puro转染HEK293T细胞,进行病毒包装。每隔24小时后收获病毒,收获3次,分别简写为P8,P32,P46和P58病毒。

[0020] 使用表达肽适配子的病毒P8,P32,P46和P58病毒感染食管鳞癌细胞KYSE450,并用嘌呤霉素进行筛选获得稳定表达的细胞系,分别命名为KYSE450(P8),KYSE450(P32),KYSE450(P46)和KYSE450(P58);

利用构建的食管鳞癌细胞KYSE450,通过细胞增殖实验、克隆形成以及细胞侵袭实验优选最佳的肽适配子。

[0021] 本发明的有益效果在于:

(1) 构建了pBiFcVN173-CDP ΔC(101-1516)表达载体,结合结构域CDP ΔC(101-1516)与VENUS蛋白的1-172氨基酸残基进行融合表达;

(2) 利用双分子荧光互补技术,从高容量的肽适配子表达文库中筛选获得了4个靶向结合CDP ΔC(101-1516)的候选肽适配子;

(3) 构建了pCMV-Tag2B-TrxA-peptide-TrxA和pBiFcVC155-CDP ΔC(101-1516)表达载体,使候选肽适配子与Flag标签蛋白进行融合表达;

(4) 在测序结果正确的基础上,利用去内毒素质粒抽提试剂盒将相应的表达载体进行抽提,将它们按组合的方式共转染HEK293T细胞,免疫共沉淀结果表明,肽适配子P8,P32,P46和P58均能与CDP ΔC(101-1516)结构域特异并高亲和结合;

(5) 通过构建,获得了表达肽适配子P8,P32,P46和P58的慢病毒表达载体PCDH-CMV-TrxA-peptide-TrxA-IRES-GFP-EF1-Puro,并通过包装,获得了相应的病毒,通过感染食管鳞癌细胞系和药物筛选,我们获得了稳定表达肽适配子P8,P32,P46和P58的食管鳞癌细胞系:KYSE450(P8),KYSE450(P32),KYSE450(P46)和KYSE450(P58);

(6) 利用构建的食管鳞癌细胞KYSE450,通过细胞增殖实验、克隆形成以及细胞侵袭实验优选获得最佳的肽适配子P8(LNLFTFRLKICV),该适配子能显著食管鳞癌细胞的增殖和侵袭,可以被用于制备食管鳞癌治疗的候选药物。

附图说明

[0022] 图1为用于双分子荧光互补以及免疫共沉淀的相关表达载体示意图。A:泳道1代表CDP-SOX2结合结构域CDP ΔC(101-1516);泳道2为CDP ΔC(101-1516)与pBiFcVN173载体连接后的载体构建鉴定。B:泳道1、3、5、7分别代表筛选出的靶向CDP-SOX2结合结构域的肽适配子PEPTIDE 8、PEPTIDE 32、PEPTIDE 46、PEPTIDE 58;泳道2、4、6、8为筛选出的肽适配子

与PCMV-Tag2B载体连接后的载体构建鉴定。

[0023] 图2为双分子荧光互补筛选与CDP-Sox2结合结构域特异结合的肽适配子示意图,红色荧光为内参。

[0024] 图3 为免疫共沉淀验证CDP-Sox2结合结构域与筛选的候选肽适配子之间的相互作用示意图。

[0025] 图4表达特异肽适配子的慢病毒载体构建。泳道1、2、3、4分别代表筛选出的肽适配子PEPTIDE 8、PEPTIDE 32、PEPTIDE 46、和PEPTIDE 58与慢病毒载体PCDH-IRES-GFP连接后的载体构建鉴定。

[0026] 图5表达特异肽适配子的重组慢病毒的包装(A为荧光视野,B为白光视野)。

[0027] 图6 稳定表达特异肽适配子的KYSE450细胞系建立(A为荧光视野,B为白光视野)。

具体实施方式

[0028] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中的实验材料,如无特殊说明,均为常规生化试剂销售店获取。以下实施例中的定量实验,均设置为独立的三次重复实验,结果取平均值。

[0029] 实施例1

基于双分子荧光互补技术的CDP Δ C (101-1516) 结构域融合表达载体构建和特异肽适配子筛选包括以下步骤

步骤1) pBiFcVN173-CDP Δ C (101-1516) 表达载体构建:以人食管鳞癌细胞系KYSE450的RNA反转录的cDNA为模板,设计引物对CDP Δ C (101-1516) 片段进行高保真PCR扩增,并使用限制性内切酶EcoRI和XbaI对扩增产物进行酶切后,将其插入pBiFcVN173载体,以形成pBiFcVN173-CDP Δ C (101-1516) 表达载体。扩增引物序列如下:正向引物:5'-CGGAATTCAATGGCGGCCAATGTGG GAT-3' (末端为EcoRI酶切位点);反向引物:5'-TGCTCTAGATGGGACGTCAA TCAATCTTTT-3' (末端为XbaI酶切位点)。经酶切鉴定和测序结果表明:获得了预期的表达CDP Δ C (101-1516) 靶标并可用于双荧光互补的载体(图1)。

[0030] PCR反应条件如下:

反应体系

试剂	体积
5XBuffer	10 μ l
正向引物 (10 μ M)	1.5 μ l
反向引物 (10 μ M)	1.5 μ l
Fast pfu(2.5u/ μ l)	1 μ l
dNTPmix(10mM)	1.3 μ l
模板	0.5 μ l
ddW	34.2 μ l
总体积	50 μ l

PCR反应条件

95 $^{\circ}$ C 2min
 95 $^{\circ}$ C 20sec
 60 $^{\circ}$ C 20sec
 72 $^{\circ}$ C 30sec
 72 $^{\circ}$ C 5min

35cycles

步骤2) 使用去内毒素质粒提取试剂盒抽提测序正确的pBiFcVN173-CDP Δ C (101-1516) 和pDsRED2-C1载体,随机挑取30个肽适配子文库质粒,使用Lipofectamine 2000转染试剂,将200ng 随机挑取的pBiFc-VC155-TrxA-peptide -TrxA 文库质粒,200ng pBiFcVN173-Sox2和50ng pDsRED2-C1 (pDsRed2-C1转染的红色荧光作为内参)载体分别形成30个不同组合共转染于12孔板的HEK293T细胞中。

[0031] 步骤3) 将转染的HEK293T细胞放置于细胞培养箱中培养24小时后,在荧光显微镜下观察到荧光的出现。初步结果表明其中4个肽适配子能特异与CDP Δ C (101-1516) 结构域特异结合,从而快速初步筛选获得靶向特异结合CDP Δ C (101-1516) 结构域的肽适配子(图2),候选肽适配子TrxA-peptide-TrxA中peptide相应的氨基酸序列见表1,列表中序列不包含侧翼的TrxA序列。

[0032] 表1为与CDP Δ C (101-1516) 结合结构域特异结合的候选肽适配子的测序结果及氨基酸序列。

编号	随机核苷酸序列	对应的肽段序列	荧光出现
P8	TTAAATCTGTTTACTTTTAGGTTGAAGATCTGTGTG	LNLFTEFLKICV	强荧光
P32	CTGTTTTATATTATTTTCTTTTGGTTCCTTG	LFYTYFSFWFL	强荧光
P46	ACACCCGTTTCTTACCTCCTTTTCTCCTCAATG	TPVFLPPFSPM	强荧光
P58	TACCTGTTTGCTATTATCTTTCTCTCTCTTG	YLFAYSFSSL	强荧光

[0033] 实施例2

靶向结合CDP Δ C (101-1516) 结构域的肽适配子的鉴定包括以下步骤:

1) 用于表达候选肽适配子的真核表达载体构建【Peptide-FLAG, peptide指AA (11)】

设计特异引物对TrxA-peptide-TrxA进行高保真PCR扩增,peptide分别指P8,P32,P46,P58。使用限制性内切酶EcoRI和BamHI对扩增产物进行酶切后,将这4个候选肽适配子的酶切片段分别插入pCMV-Tag2B载体中,获得pCMV-Tag2B-TrxA-peptide-TrxA载体,这些载体可以表达与FLAG融合表达的肽适配子,分别为pCMV-Tag2B-TrxA- P8-TrxA,pCMV-Tag2B-TrxA- P32-TrxA ,pCMV-Tag2B-TrxA- P46-TrxA,pCMV-Tag2B-TrxA- P58-TrxA(图1)。

[0034] 扩增引物序列如下:正向引物:5'-CGGGATCCATGAGCGATAAA ATTATTCAC-3'(末端为BamHI酶切位点);反向引物:5'-CGGAATTCAGGTT AGCGTCGAGGAA-3'(末端为EcoRI酶切位点),PCR反应条件如下:

反应体系

试剂	体积
5XBuffer	10 μ l
正向引物 (10 μ M)	1.5 μ l
反向引物 (10 μ M)	1.5 μ l
Fast pfu(2.5u/ μ l)	1 μ l
dNTPmix(10mM)	1.3 μ l
模板	0.5 μ l
ddW	34.2 μ l
总体积	50 μ l

PCR反应条件

95 $^{\circ}$ C 2min
 95 $^{\circ}$ C 20sec
 60 $^{\circ}$ C 20sec
 72 $^{\circ}$ C 15sec
 72 $^{\circ}$ C 5min

35cycles

2) 用于表达CDP Δ C (101-1516) 结构域的表达载体pBiFcVC155-CDP Δ C (101- 1516) 构建。设计特异引物对CDP Δ C (101-1516) 进行高保真PCR扩增,使用限制性内切酶SaII和KpnI对扩增产物进行酶切后,将酶切片段插入pBiFcVC155载体,获得了pBiFcVC155-CDP Δ C (101-1516) 表达载体。引物序列如下,正向引物:5'-acgcGTCGACCATGGCGGCCAATGTGGGAT-3'(末端为SaII酶切位点);反向引物:5ggGGTACCTGGGACGTCAATCAATCTTTT3(末端为KpnI酶切位点)。

[0035] 3) 免疫共沉淀验证肽适配子与CDP Δ C (101-1516) 结构域的特异结合

将融合表达载体分成四组,分别为pCMV-Tag2B-TrxA-P8-TrxA和pBiFcVC155-CDP Δ C (101-1516),pCMV-Tag2B-TrxA-P32-TrxA和pBiFcVC155-CDP Δ C (101-1516),pCMV-Tag2B-TrxA-P46-TrxA和pBiFcVC155-CDP Δ C (101-1516),pCMV-Tag2B-TrxA-P58-TrxA和pBiFcVC155-CDP Δ C (101-1516)。分别使用转染试剂PEI将这四组载体共转入HEK293T细胞,收获蛋白并使用Flag标签抗体做免疫共沉淀,用CDP抗体做免疫印迹实验验证,由图3可知,CDP Δ C (101-1516) 与TrxA-P8-TrxA,TrxA-P32-TrxA,TrxA-P46-TrxA和TrxA-P58-TrxA均能紧密结合。

[0036] 实施例3

稳定表达靶向CDP Δ C (101-1516) 结构域的肽适配子的食管鳞癌细胞系建立和功能实验包括以下步骤:

1) 表达特异肽适配子的慢病毒载体构建和病毒包装

设计特异引物对TrxA-peptide-TrxA进行高保真PCR扩增,peptide分别指P8,P32,P46,P58。使用限制性内切酶EcoRI和BamHI对扩增产物进行酶切后,将这4个候选肽适配子的酶切片段分别插入PCDH-CMV-MCS-IRES-GFP-EF1-Puro载体中,获得PCDH-CMV-TrxA-peptide-TrxA-IRES-GFP-EF1-Puro表达载体,分别为PCDH-CMV-TrxA-P8-TrxA-IRES-GFP-EF1-Puro,PCDH-CMV-TrxA-P32-TrxA-IRES-GFP-EF1-Puro,PCDH-CMV-TrxA-P46-TrxA-IRES-GFP-EF1-Puro 和PCDH-CMV-TrxA-P58-TrxA-IRES-GFP-EF1-Puro(图4)。

[0037] 扩增引物序列如下:正向引物5'-CGGAATTCGCCACCATGAGCGATAA AATTATTCAC-3'(末端为EcoRI酶切位点);反向引物:5'-CGGGATCCTCAC AGGTTAGCGTCGAGGAA-3'(末端为BamHI酶切位点),PCR反应条件如下:

反应体系

试剂	体积
5XBuffer	10 μ l
正向引物(10 μ M)	1.5 μ l
反向引物(10 μ M)	1.5 μ l
Fast pfu(2.5u/ μ l)	1 μ l
dNTPmix(10mM)	1.3 μ l
模板	0.5 μ l
ddW	34.2 μ l
总体积	50 μ l

PCR反应条件

95 $^{\circ}$ C 2min
 95 $^{\circ}$ C 20sec
 60 $^{\circ}$ C 20sec
 72 $^{\circ}$ C 15sec
 72 $^{\circ}$ C 5min

32cycles

2) 稳定表达特异肽适配子的食管鳞癌细胞系的建立

使用去内毒素质粒提取试剂盒抽提测序正确的PCDH-CMV-TrxA-peptide-TrxA-IRES-GFP-EF1-Puro分别与PHR和VSVG按一定比例溶于HBSS,并与转染试剂PEI进行混匀,加入至包装细胞HEK293T细胞中,每隔24小时收集病毒上清,收集3次后,离心并过滤获得表达特异肽适配子的慢病毒(图5)。

[0038] 接种食管鳞癌细胞株KYSE450,使用收获的慢病毒上清感染KYSE450细胞,并加入Polybrene(终浓度8 μ g/ml),12小时后换液,感染48小时后进行嘌呤霉素药物筛选,未感染组和感染组分别加入嘌呤霉素并最终获得稳定表达特异肽适配子的食管鳞癌细胞系:KYSE450(P8),KYSE450(P32),KYSE450(P46)和KYSE450(P58)(图6)。

[0039] 3) 稳定表达特异肽适配子的食管鳞癌细胞系的功能分析

将相同数量的KYSE450(P8),KYSE450(P32),KYSE450(P46)和KYSE450(P58)分别接种细胞6孔板,在接种后的第1天,第2天,第3天和第4天分别计数,分析细胞增殖曲线的变化,通过统计分析后发现:与对照相比,KYSE450(P8),KYSE450(P32),KYSE450(P46)和KYSE450(P58)的增殖能力均比对照降低。

[0040] 将相同数量的KYSE450(P8),KYSE450(P32),KYSE450(P46)和KYSE450(P58)分别接种细胞6孔板,在接种后的第7天,结晶紫染色后,拍照计数,观察形成的大克隆数,通过统计分析后发现:与对照相比,KYSE450(P8)和KYSE450(P58)的大克隆形成能力均显著降低。

[0041] 将相同数量的KYSE450(P8),KYSE450(P32),KYSE450(P46)和KYSE450(P58)分别接

种于铺好Matrigel的Transwell小室,在接种后的48小时,结晶紫染色后,拍照计数,使用结晶紫对穿过小室的细胞就染色,并计数,通过统计分析后发现:与对照相比,KYSE450 (P8)、KYSE450 (P32) 和KYSE450 (P46) 的侵袭能力显著降低,在候选肽适配子中,KYSE450 (P32) 的侵袭能力最低。但是,通过综合增殖和侵袭方面的结果,我们认为肽适配子P8:LNLFTFRLKICV最适合用于食管鳞癌肽适配子药物的制备和后期的药理研究。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国人民解放军南京军区福州总医院

<120> Sox2-CDP结合结构域的候选肽适配子

<130> 21

<160> 13

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> P8

<400> 1

Leu Asn Leu Phe Thr Phe Arg Leu Lys Ile Cys Val

1 5 10

<210> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> CDP Δ C(101-1516) 结构域

<400> 2

Met Ala Ala Asn Val Gly Ser Met Phe Gln Tyr Trp Lys Arg Phe Asp

1 5 10 15

Leu Gln Gln Leu Gln Arg Glu Leu Asp Ala Thr Ala Thr Val Leu Ala

20 25 30

Asn Arg Gln Asp Glu Ser Glu Gln Ser Arg Lys Arg Leu Ile Glu Gln

35 40 45

Ser Arg Glu Phe Lys Lys Asn Thr Pro Glu Asp Leu Arg Lys Gln Val

50 55 60

Ala Pro Leu Leu Lys Ser Phe Gln Gly Glu Ile Asp Ala Leu Ser Lys

65 70 75 80

Arg Ser Lys Glu Ala Glu Ala Ala Phe Leu Asn Val Tyr Lys Arg Leu

85 90 95

Ile Asp Val Pro

100

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Leu Phe Tyr Ile Tyr Phe Ser Phe Trp Phe Leu

1	5	10
<210> 4		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<400> 4		
Thr Pro Val Phe Leu Pro Pro Phe Ser Pro Met		
1	5	10
<210> 5		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<400> 5		
Tyr Leu Phe Ala Ile Tyr Ser Phe Ser Ser Leu		
1	5	10
<210> 6		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 6		
ttaaattctgt ttacttttag gttgaagatc tgtgtg		36
<210> 7		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 7		
ctgttttata tttatttttc tttttggttc ttg		33
<210> 8		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 8		
acaccgttt tcttacctcc tttttetcca atg		33
<210> 9		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 9		
tacctgtttg ctattttatc tttctcttct ttg		33

<210> 10	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
cgggatccat gagcgataaa attattcac	29
<210> 11	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
cggaattcca ggttagcgtc gaggaa	26
<210> 12	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	
acgcgtcgac catggcggcc aatgtgggat	30
<210> 13	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
ggggtacctg ggacgtcaat caatctttt	29

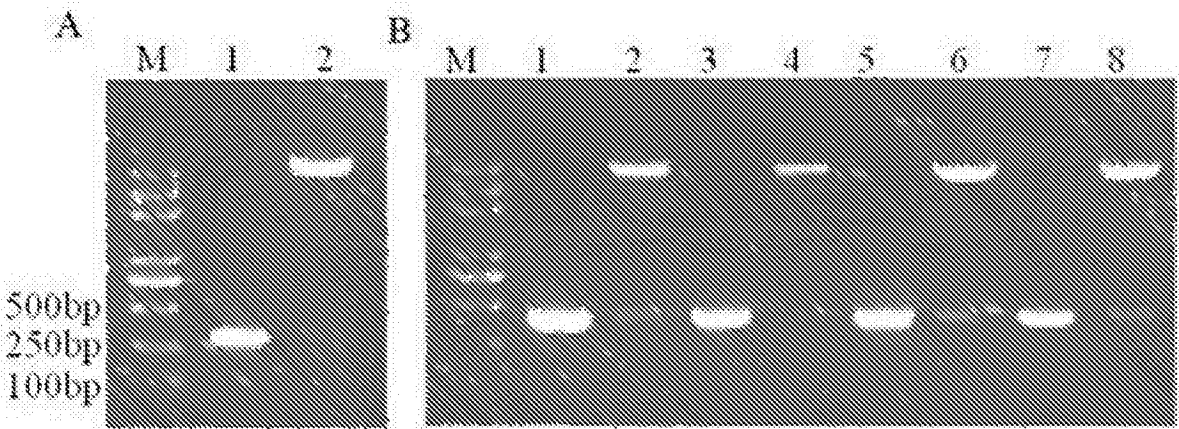


图1

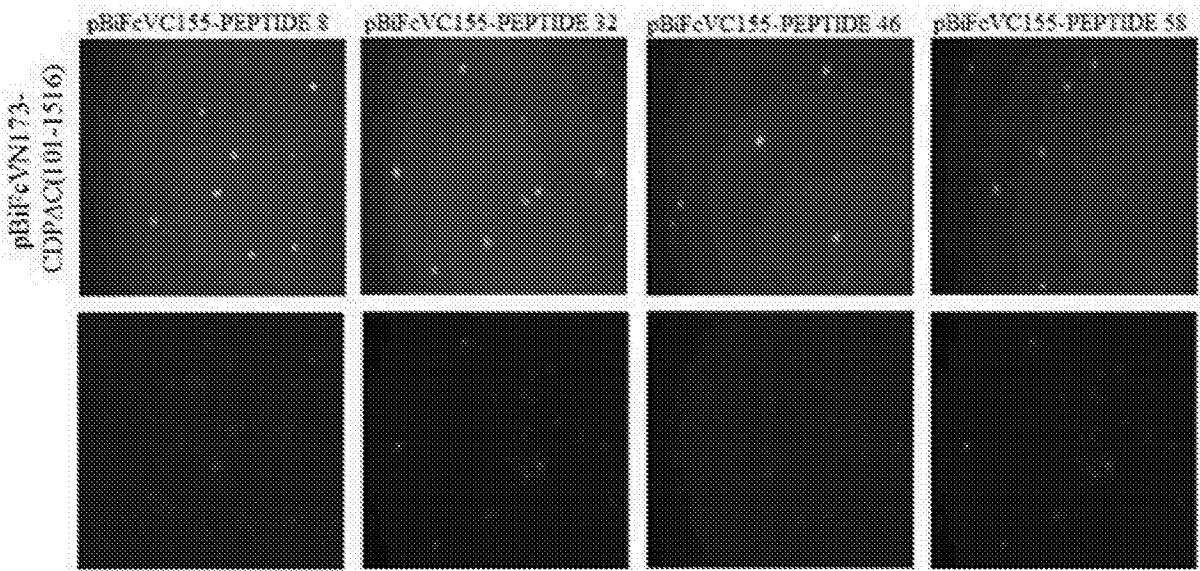


图2

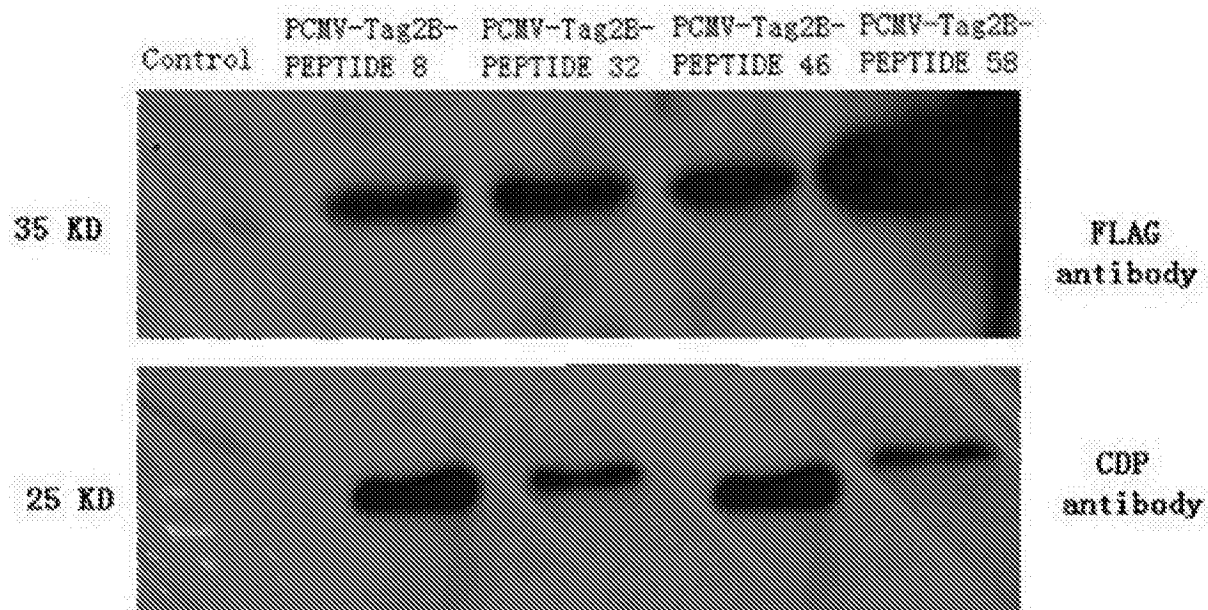


图3

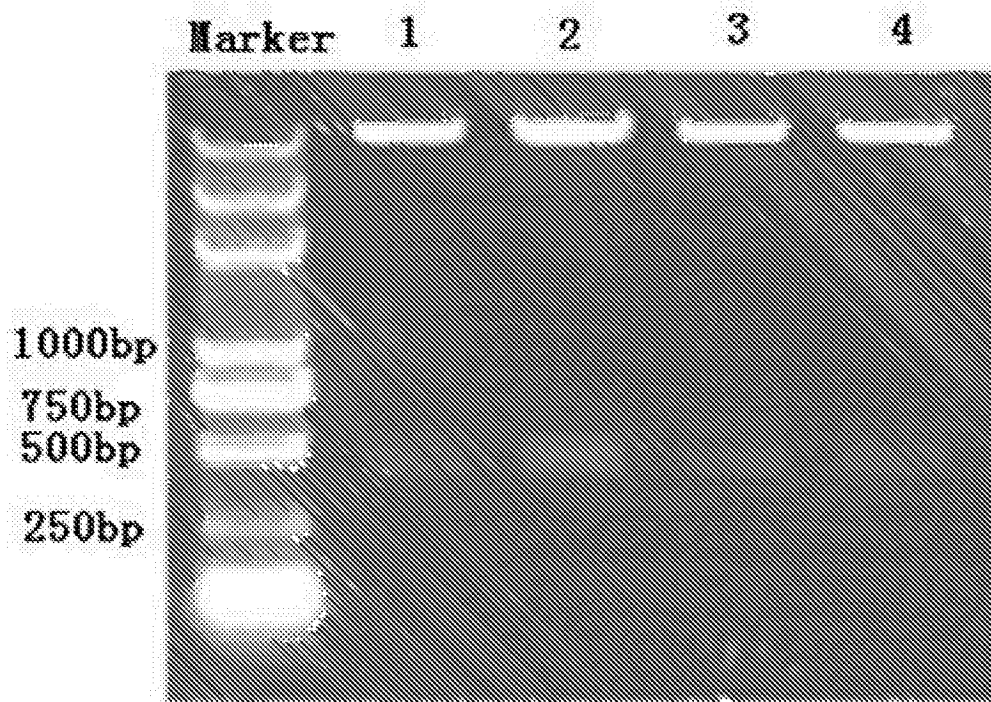


图4

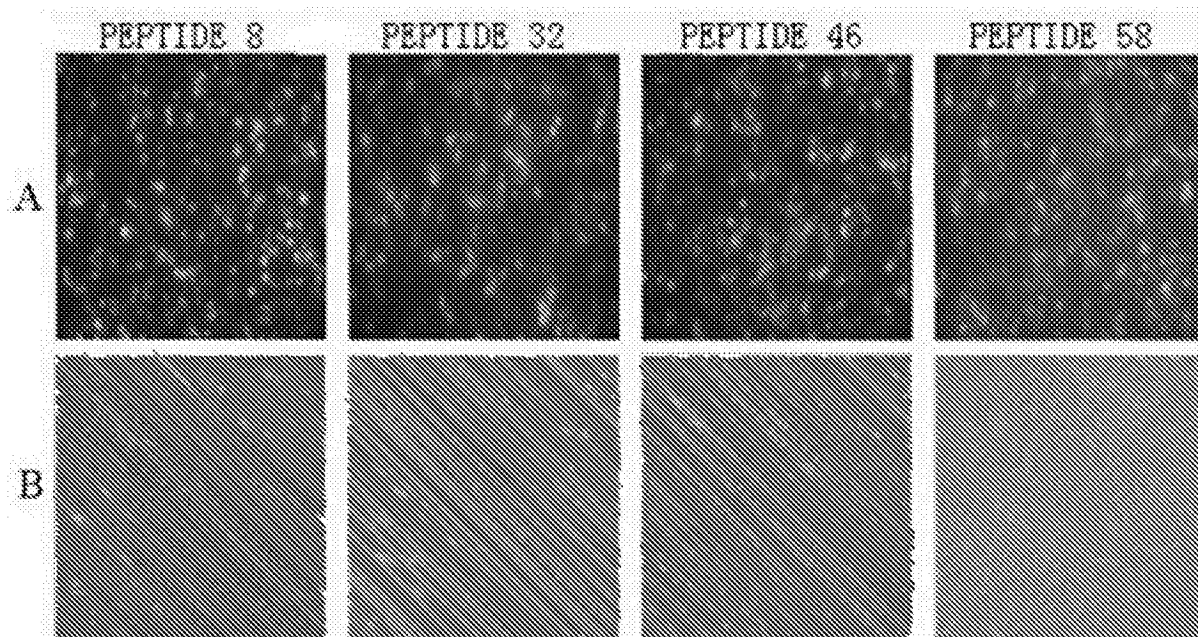


图5

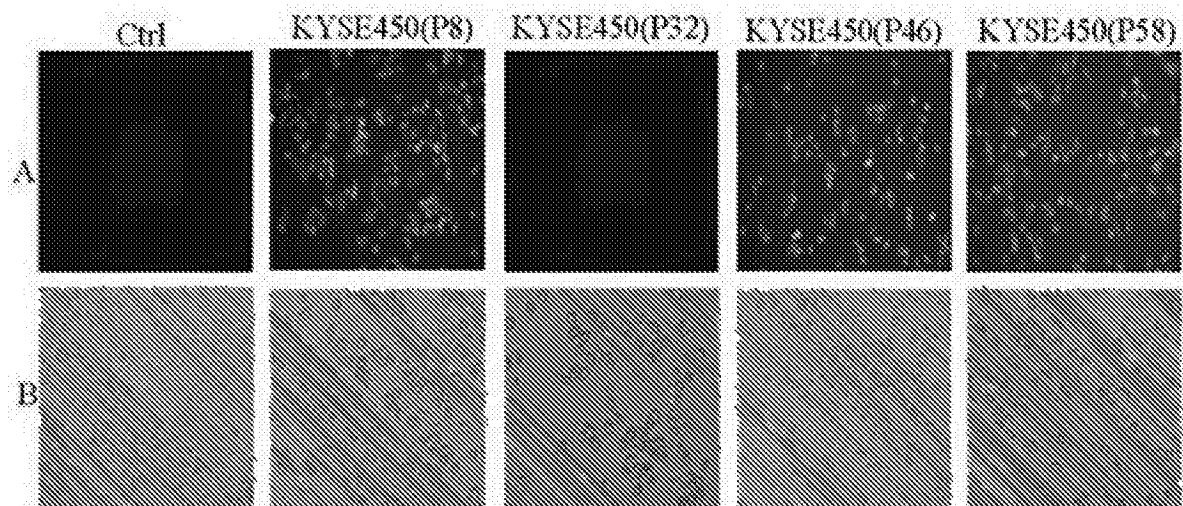


图6

专利名称(译)	Sox2-CDP结合结构域的候选肽适配子		
公开(公告)号	CN106589061A	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201611108005.1	申请日	2016-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军南京军区福州总医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军南京军区福州总医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军南京军区福州总医院		
[标]发明人	刘宽灿 谢富安 林宝顺 张蕊 肖章武 胡琼 洪笑迁		
发明人	刘宽灿 谢富安 林宝顺 张蕊 肖章武 胡琼 洪笑迁		
IPC分类号	C07K7/06 C07K7/08 G01N33/539 G01N33/68		
CPC分类号	C07K7/06 C07K7/08 G01N33/539 G01N33/6845 G01N2333/47		
代理人(译)	蔡学俊 陈彩芳		
其他公开文献	CN106589061B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供Sox2-CDP结合结构域的候选肽适配子，所述肽适配子序列为：P8：LNLFTFRLKICV，利用双分子荧光互补和免疫共沉淀技术进行特异肽适配子的鉴定方法，通过功能分析，我们从中筛选获得了Sox2-CDP结合结构域的有效肽适配子候选药物。本发明获得的肽适配子亲和性高、特异性强，具有显著的肿瘤抑制功能，因此，本发明极具应用价值。

