



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105363070 B

(45)授权公告日 2016.11.23

(21)申请号 201510830665.X

A61L 27/52(2006.01)

(22)申请日 2015.11.25

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 103421199 A,2013.12.04,

申请公布号 CN 105363070 A

CN 104356402 A,2015.02.18,

(43)申请公布日 2016.03.02

CN 101337985 A,2009.01.07,

(73)专利权人 中国石油大学(华东)

WO 03072155 A1,2003.09.04,

地址 266555 山东省青岛市经济技术开发

曹长海.短肽自组装水凝胶及其在细胞培养方面应用的研究.《中国博士学位论文全文数据库》.2015,

区长江西路66号

(72)发明人 陈翠霞 徐海 王景新 张宇

审查员 王墩

白景琨

(74)专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公

司 37205

代理人 张红凤

(51)Int.Cl.

A61L 27/22(2006.01)

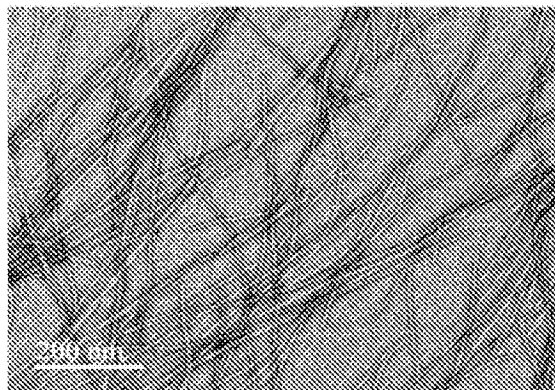
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

一种可用于细胞粘附的水凝胶及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种可用于细胞粘附的水凝胶及其制备方法,其是以Ac-IIIISLGK-NH₂与左旋谷氨酰胺(L-Gln)在酶促反应的作用下形成的,其中,Ac-IIIISLGK-NH₂的N端乙酰化,C端氨基化,Ac-IIIISLGK-NH₂与左旋谷氨酰胺的摩尔比为1:1,反应温度为37~40℃,反应时间为24~48h。本发明制备得到的水凝胶能使细胞很好的粘附在细胞表面,同时制备得到的水凝胶毒性低、生物相容性好且不引起淋巴细胞产生非特异性免疫反应,是一类较为理想的纳米组织工程材料,对人类生命健康具有重要意义。



1. 一种用于细胞粘附的水凝胶的制备方法,其特征在于:其是以Ac-IIIISLGK-NH₂与左旋谷氨酰胺在酶促反应的作用下形成的,其中,Ac-IIIISLGK-NH₂的N端乙酰化,C端氨基化,Ac-IIIISLGK-NH₂与左旋谷氨酰胺的摩尔比为1:1,Ac-IIIISLGK-NH₂的摩尔浓度为4~16mM,反应温度为37~40℃,反应时间为24~48h,酶促反应中使用的混合液为谷氨酰胺转移酶溶液和含Ca²⁺的缓冲液。

2. 根据权利要求1所述的用于细胞粘附的水凝胶的制备方法,其特征在于:所述Ac-IIIISLGK-NH₂的摩尔浓度为7.27mM。

3. 根据权利要求2所述的用于细胞粘附的水凝胶的制备方法,其特征在于,所述谷氨酰胺转移酶溶液的制备方法为:

a配置底物溶液,将61.7mg DTT溶于20mL 50mM Tris-HCl且pH为7.8缓冲溶液中,冷藏于4℃待用;

b取1mL所得底物溶液,将1mg 200U/g TG酶溶于该底物溶液中,即得1mL浓度为200U/mL的谷氨酰胺转移酶溶液。

4. 根据权利要求2所述的用于细胞粘附的水凝胶的制备方法,其特征在于,所述含Ca²⁺的缓冲液是将6.17mg DTT和0.011g CaCl₂溶于20mL纯水中制备得到的。

5. 根据权利要求1~4任一项制备方法制备得到的水凝胶,其特征在于:所述水凝胶为具有网格状的纤维结构。

一种可用于细胞粘附的水凝胶及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及水凝胶的制备技术领域,具体涉及一种可用于细胞粘附的水凝胶及其制备方法。

背景技术

[0002] 理想的组织工程材料不仅需要具备支持并连接组织的网架结构,而且需要在调节组织发生和细胞的生理活动方面具有优势。目前大多数支架材料多采用生物大分子(壳聚糖,海藻酸盐,胶原蛋白)或合成高分子(聚乙二醇)等,用以提供支撑细胞生长的微环境。但化学残留,病原传播及合成成本等问题限制了其深入应用。

[0003] 自然界中的谷氨酰胺转氨酶广泛存在于人体、高级动物、植物和微生物中,可以催化酰基转移反应,它能催化蛋白质中谷氨酰胺残基的 γ -碳酰胺与赖氨酸的 ϵ -氨基之间形成共价键,形成 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸异肽键,这种交联反应在自然界中主要发生在生物体内伤口愈合和以及形成和稳定细胞外基质的过程中。由于这种酶具有很高的催化活性,反应条件温和,同时依赖 Ca^{2+} ,反应过程简单可控。因此可以被用于多肽自组装体的修饰,超分子结构的构筑等方面,有着广阔的生物应用前景。

[0004] 目前,水凝胶的主要制备方法有物理交联和化学交联两种途径。物理交联型水凝胶的形成主要靠次级键价力的作用,因静电作用、氢键、疏水相互作用等的存在而形成的网络结构。但物理交联形成的水凝胶一般力学性能较弱,交联网络容易因离子强度、pH值和温度等外部环境的改变而破坏,一般不能满足组织工程的实际应用需要;化学交联型水凝胶通常运用传统的合成聚合物的方法或光聚合、辐射聚合等技术,引发共聚或缩聚反应产生共价键而形成的共价交联网络。在制备过程中往往需要大量使用光引发剂、交联剂以及有机溶剂等具有细胞毒性的添加剂,造成水凝胶具有较差的生物相容性,同时无引发剂的光引发方式不但效率相对较低,而且局部温度过热会损伤周围的细胞和组织。这种方法得到的水凝胶其生物学性能(如细胞粘附,迁移,分化等)会因原料分子、交联密度及亲疏水性各不相同。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种可用于细胞粘附的水凝胶及其制备方法,选用Ac-IIIISLGK-NH₂与左旋谷氨酰胺在酶促反应的作用下制备水凝胶,其以Ac-IIIISLGK-NH₂作为支架,在酶促反应的作用下,将左旋谷氨酰胺(L-Gln)连接在纳米纤维表面,能够很好的促使细胞的粘附。

[0006] 本发明的任务之一是提供一种可用于细胞粘附的水凝胶的制备方法。

[0007] 一种可用于细胞粘附的水凝胶的制备方法,其是以Ac-IIIISLGK-NH₂与左旋谷氨酰胺在酶促反应的作用下形成的,其中,Ac-IIIISLGK-NH₂的N端乙酰化,C端氨基化,Ac-IIIISLGK-NH₂与左旋谷氨酰胺的摩尔比为1:1,Ac-IIIISLGK-NH₂的摩尔浓度为4~16mM,反应温度为37~40℃,反应时间为24~48h。

- [0008] 作为本发明的一个优选方案,上述Ac-IIIISLGK-NH₂的摩尔浓度为7.27mM。
- [0009] 作为本发明的另一个优选方案,上述酶促反应中选用的混合液为谷氨酰胺转移酶溶液和含Ca²⁺的缓冲液。
- [0010] 优选的,上述谷氨酰胺转移酶溶液的制备方法为:
- [0011] a配置底物溶液,将61.7mg DTT溶于20mL 50mM Tris-HCl且pH为7.8缓冲溶液中,冷藏于4℃待用;
- [0012] b取1mL所得底物溶液,将1mg 200U/g TG酶溶于该底物溶液中,即得1mL浓度为200U/mL的谷氨酰胺转移酶溶液。
- [0013] 优选的,上述含Ca²⁺的缓冲液是将6.17mg DTT和0.011g CaCl₂溶于20mL纯水中制备得到的。
- [0014] 本发明的任务之二是提供上述制备方法得到的水凝胶。
- [0015] 上述水凝胶为具有网格状的纤维结构。
- [0016] 本发明所带来的有益技术效果:
- [0017] 从原料的选取上,本发明选用氨基酸组成较少的两亲性短肽Ac-IIIISLGK-NH₂作为支架,通过酶促反应将左旋谷氨酰胺(L-Gln)嫁接之上,从而使其形成酶催化水凝胶,为多肽的表面修饰提供了新思路,丰富了水凝胶的种类。
- [0018] 本发明涉及的两亲性短肽Ac-IIIISLGK-NH₂,氨基酸含量较少,本发明制备方法合成成本低,合成条件易于控制,且能诱导细胞粘附,即:本发明制备得到的水凝胶能使细胞很好的粘附在细胞表面(见说明书附图7),同时制备得到的水凝胶毒性低、生物相容性好且不引起淋巴细胞产生非特异性免疫反应,是一类较为理想的纳米组织工程材料,对人类生命健康具有重要意义。

附图说明

- [0019] 下面结合附图对本发明做进一步说明:
- [0020] 图1为本发明两亲性短肽Ac-IIIISLGK-NH₂在Tris-HCl溶液中的原子力显微镜形貌图;
- [0021] 图2为本发明两亲性短肽Ac-IIIISLGK-NH₂在Tris-HCl溶液中的透射电子显微镜形貌图;
- [0022] 图3为本发明两亲性短肽Ac-IIIISLGK-NH₂与L-Gln在谷氨酰胺转移酶溶液中24小时后的原子力显微镜形貌图;
- [0023] 图4为本发明两亲性短肽Ac-IIIISLGK-NH₂与L-Gln在谷氨酰胺转移酶溶液中24小时后的透射电子显微镜形貌图;
- [0024] 图5、图6为本发明两亲性短肽Ac-IIIISLGK-NH₂与L-Gln在谷氨酰胺转移酶溶液中24小时后形成水凝胶的机械强度(存储模量和损耗模量)与频率之间的关系图;
- [0025] 图7为本发明两亲性短肽Ac-IIIISLGK-NH₂与L-Gln在谷氨酰胺转移酶溶液中24小时后形成水凝胶对MC 3T3细胞的粘附图;
- [0026] 图8为本发明两亲性短肽Ac-IIIISLGK-NH₂与L-Gln在谷氨酰胺转移酶溶液中24小时后形成水凝胶对淋巴细胞产生炎症因子的影响效果图。

具体实施方式

[0027] 为了使本发明的优点、技术方案更加清楚、明确,下面结合具体实施例对本发明做详细说明。

[0028] 首先对本发明制备方法及其性能检测中所用到的主要实验仪器的型号及规格做简要说明:

[0029] 电热恒温孵育箱(DNP-9082,上海精宏试验设备有限公司);

[0030] 干燥消毒烤箱(DHG-9246A,上海精宏试验设备有限公司);

[0031] 台式离心机(艾本德,德国);

[0032] 原子力显微镜(AFM)(Nanoscope Iva MultiMode AFM,布鲁克,德国)

[0033] 透射电子显微镜(TEM)(JEM1400Plus,捷欧路,日本)

[0034] 流变仪(Mars III,哈克)

[0035] 超净工作台(Airtech,江苏安泰)

[0036] 恒温细胞培养箱(HERACELL 150i,赛默飞世尔,法国)

[0037] 倒置显微镜(TS100,尼康,日本)

[0038] 荧光倒置显微镜(DMI3000B,莱卡,德国)

[0039] 一次性细胞培养瓶(25cm²,康宁)

[0040] 一次性移液管(5mL,康宁)

[0041] 一次性细胞培养板(3599,康宁)

[0042] 一次性细胞培养板(3548,康宁)

[0043] 液氮容器(YDS-30-125,东亚液氮容器)

[0044] 微波辅助多肽合成仪(微波多肽自动合成仪,华盛昌)。

[0045] 其次,对本发明所选用的主要原料做详细说明,本发明所选用的Ac-IIIISLGK-NH₂是自制的,其具体制备方法为:

[0046] 步骤1、蒸馏N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和哌啶(Piperidine)溶剂

[0047] 将购买的DMF溶液在60℃条件下减压蒸馏,去除蒸馏前后液各10mL左右,得到纯的DMF溶剂;将购买的哌啶中加入少量CaH₂加热回流1-2小时,接收沸点温度(106℃)的馏分,得到纯的哌啶溶剂;

[0048] 步骤2、氨基酸、树脂、活化剂、盖帽剂、去保护剂等的配制

[0049] 多肽固相合成仪上计算出制备0.25mM Ac-IIIISLGK-NH₂所需氨基酸和其他试剂的用量(为保证多肽合成时,两亲性短肽的纯度,氨基酸的用量加倍,其终浓度为0.2M):

[0050] Lys(赖氨酸):1.03g溶于11mL DMF中;

[0051] Gly(甘氨酸):0.65g溶于11mL DMF中;

[0052] Ile(异亮氨酸):2.26g溶于32mL DMF中;

[0053] Leu(亮氨酸):0.78g溶于11mL DMF中;

[0054] Ser(丝氨酸):0.84g溶于11mL DMF中;

[0055] 树脂(载量为0.6mmol/g):0.417g;

[0056] 注意:氨基酸的 α -氨基均为Fmoc保护,Lys的侧链氨基也被保护;

[0057] 活化剂:苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯(HBTU):5.29g;1-羟基苯并

三唑(HOBT):1.88g;溶于31mL DMF;

[0058] 活化碱:N,N-二异丙基乙胺(DIEA):5.57mL;DMF:10.43mL;

[0059] 盖帽剂:乙酸酐:2.2mL;N,N-二异丙基乙胺(DIEA):0.239g;HOBT:0.022g;溶于8.8mL DMF中;

[0060] 裂解剂:三氟乙酸(TFA):14.25mL;三异丙基硅烷(TIS):0.375mL;H₂O:0.375mL;

[0061] 去保护剂:哌啶:39.6mL;DMF:158.4mL;1-羟基苯并三唑(HOBT):2.67g;

[0062] 步骤3、多肽的固相合成及纯化

[0063] 将步骤2中的准备好的药品加入到微波固相合成仪指定容器内,开始从C端到N端合成Ac-IIISL GK-NH₂,仪器自动合成,多肽合成完毕后,将产品管内的产品倒入圆底烧瓶中,加入裂解剂,室温搅拌4h,真空抽滤后收集滤液,TFA洗涤树脂3次,合并滤液和洗涤液,将其倒入蒸馏瓶中蒸馏(除去残存的TFA),蒸馏后的产品倒入10mL离心管中,加入冷乙醚,离心15min,转速为9000rpm/min,重复10次以上,制备型反相高效液相纯化,最后将产品放入高压冻干机内冻干,冻干后放入冰箱内保存,基质辅助激光解吸飞行时间质谱分析。

[0064] 对上述制备得到的Ac-IIISL GK-NH₂在Tris-HCl缓冲液中的自组装形貌进行检测(AFM,TEM)

[0065] 具体方法如下:

[0066] AFM扫描:取10 μ L配好的多肽样品滴加在干净的云母片表面,静止吸附10s,然后高纯氮气吹干样品,AFM显微镜下以轻敲模式完成扫描,得到样品高度图和相图,扫描角度为0°,扫描速率1~1.5Hz。本实验采用RTESP型硅探针,针尖半径~10nm,振臂长125 μ m,弹性系数42N/m,同一样品在不同位置扫描5次,其结果显示,两亲性短肽Ac-IIISL GK-NH₂在Tris-HCl缓冲液中自组装成纤维结构如图1所示。

[0067] TEM:吸取一滴多肽溶液滴于封口膜表面,将带有碳膜的400目铜网覆盖在液滴上方,静止吸附5min,取下铜网后,用滤纸将铜网周边残余液体吸除,2%醋酸双氧铀染色5min,吸取铜网上的残余液体后,电子显微镜检测,对同一样品选取5个视野进行拍摄,其结果显示,通过透射电子显微镜观察到的两亲性短肽样品Ac-IIISL GK-NH₂在Tris-HCl缓冲液中自组装成纤维结构,与原子力显微镜观察到的一致,均为纤维状结构如图2所示。

[0068] 在酶促反应中选用的混合液为谷氨酰胺转移酶溶液和含Ca²⁺的缓冲液,谷氨酰胺转移酶溶液的具体制备方法为:

[0069] 步骤1、配置底物溶液,61.7mg DTT溶于20mL 50mM Tris-HCl缓冲溶液中,冷藏于4℃待用;

[0070] 步骤2、将1mg 200U/g TG酶溶于1mL上述溶液,得到1mL浓度为200U/mL的谷氨酰胺转移酶溶液,-20℃冻存待用。

[0071] 含Ca²⁺的缓冲液的具体制备方法为:将6.17mg DTT,0.011g CaCl₂溶于20mL纯水中,保存于4℃待用,使用时将谷氨酰胺转移酶溶液和含Ca²⁺的缓冲液等体积混合后加入反应体系中。

[0072] 实施例1:

[0073] 本发明水凝胶的制备方法,具体包括以下步骤:

[0074] 将上述制备好的Ac-IIISL GK-NH₂与左旋谷氨酰胺按照摩尔比为1:1混合,在酶促反应条件下合成,酶促反应时,Ac-IIISL GK-NH₂溶液的最终浓度为7.27mM,谷氨酰胺转移酶

TG浓度为0.9U/mL,控制温度为37℃反应24h,得水凝胶。

[0075] 检测:吸取10μL水凝胶样品滴加在新的云母片表面,静止吸附10s后,高纯氮气吹干样品,AFM扫描,取一块完整的水凝胶置于封口膜表面,将带有碳膜的400目铜网覆盖在凝胶上方,静止吸附1min,取下铜网后,用滤纸将铜网周边残余液体吸除,2%醋酸双氧铀染色1min,吸取铜网上的残余液体后,电子显微镜检测,其结果显示,酶促反应后样品交织成网状,仍然为纤维结构,如图3和图4所示。

[0076] 实施例2:

[0077] 本发明水凝胶的制备方法,具体包括以下步骤:

[0078] 将500μL Ac-IIIISLGK-NH₂(16mM)与L-Q(16mM)的混合溶液室温下放置24小时后,加入25μL TG溶液和等量的Ca²⁺依赖性溶液,充分混匀后,静置于37℃水浴锅中水浴24小时,得水凝胶。

[0079] 对该水凝胶的机械强度检测:采用哈克流变仪表征谷氨酰胺转氨酶催化的水凝胶所形成凝胶的机械性能(粘弹性),采用的测量模块为直径35mm锥度2°的锥板及对应载样台,每次测量样品体积为500μL,流变实验温度为25℃,谷氨酰胺转氨酶催化样品反应24h后,以频率为1Hz进行应力扫描,扫描范围为0.01%-100%,测定凝胶的线性粘弹区,从线性粘弹区中选取合适的应力以进行动态频率扫描,扫描范围为0.01Hz-100Hz,研究储能模量G'和损耗模量G''之间的关系,取500μL在应力为1%作用下进行0.01-10Hz的频率扫描,实验结果如图5和图6所示,显示TG催化的两亲性短肽功能化水凝胶的机械强度G'约为100Pa。

[0080] 检测一、Ac-IIIISLGK-NH₂与L-Gln在谷氨酰胺转氨酶存在条件下形成水凝胶促使细胞粘附的能力(MC-3T3)

[0081] 无菌的16mM Ac-IIIISLGK-NH₂和L-Gln直接在细胞培养孔板中等体积混合,加入终浓度为0.9U/ml的TG溶液和等量的Ca²⁺依赖性溶液,置于细胞培养箱(37℃,5%CO₂)中孵育过夜,得到底部有凝胶的细胞培养板。将Mc-3T3细胞(小鼠成骨细胞)用含有10%胎牛血清的DMDM培养基培养在细胞培养箱内,当细胞生长80%汇合后,对细胞进行收集,取上述得到的细胞加入到水凝胶表面,同时将同样数量的细胞加入到细胞培养板表面作为对比实验。加入细胞的培养板在细胞培养箱里培养24h后用钙黄绿素-AM(calcein-AM)对细胞染色,荧光倒置显微镜观察细胞的生长状况。实验结果如图7所示,显示TG催化的两亲性短肽功能化水凝胶具有促进细胞粘附的能力。

[0082] 检测二、Ac-IIIISLGK-NH₂与L-Q在谷氨酰胺转氨酶存在条件下形成水凝胶引起非特异性免疫反应检测

[0083] 将Ac-IIIISLGK-NH₂与L-Q溶解在Tris-HCl溶液中,室温(Ac-IIIISLGK-NH₂终浓度为7.27mM)下静置24小时后,加入TG溶液和等量的Ca²⁺依赖性溶液制备肽水凝胶备用。采集血液后,提取淋巴细胞,并将其接种在上述制备的水凝胶表面,37℃,5%CO₂条件下培养3天后,在溶液上清中检测炎症因子TNF-α和IL8的表达,实验结果如图8所示。TNF-α和IL8的表达量与对照相比非常低,说明不会引起非特异性免疫反应。

[0084] 实施例2:

[0085] 本发明水凝胶的制备方法,具体包括以下步骤:

[0086] 将上述制备好的Ac-IIIISLGK-NH₂与左旋谷氨酰胺按照摩尔比为1:1混合,在酶促反应条件下合成,酶促反应时,Ac-IIIISLGK-NH₂溶液的最终浓度为4mM,谷氨酰胺转移酶TG

浓度为0.9U/mL,控制温度为40℃反应48h,得水凝胶。

[0087] 实施例3:

[0088] 本发明水凝胶的制备方法,具体包括以下步骤:

[0089] 将上述制备好的Ac-IIIISLGK-NH₂与左旋谷氨酰胺按照摩尔比为1:1混合,在酶促反应条件下合成,酶促反应时,Ac-IIIISLGK-NH₂溶液的最终浓度为16mM,谷氨酰胺转移酶TG浓度为0.9U/mL,控制温度为38℃反应36h,得水凝胶。

[0090] 需要说明的是,在本说明书的教导下本领域技术人员所做出的任何等同方式,或明显变型方式均应在本发明的保护范围内。

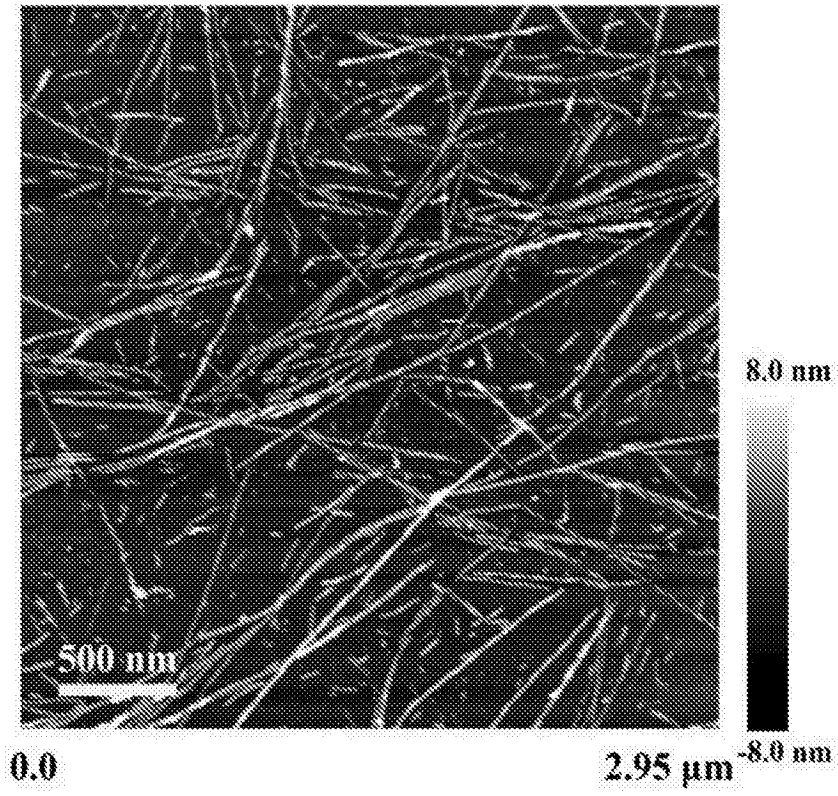


图1

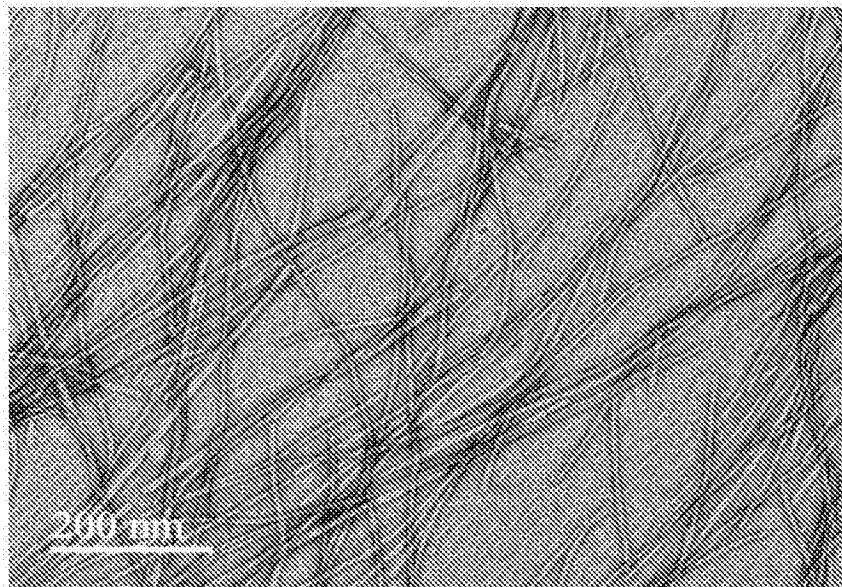


图2

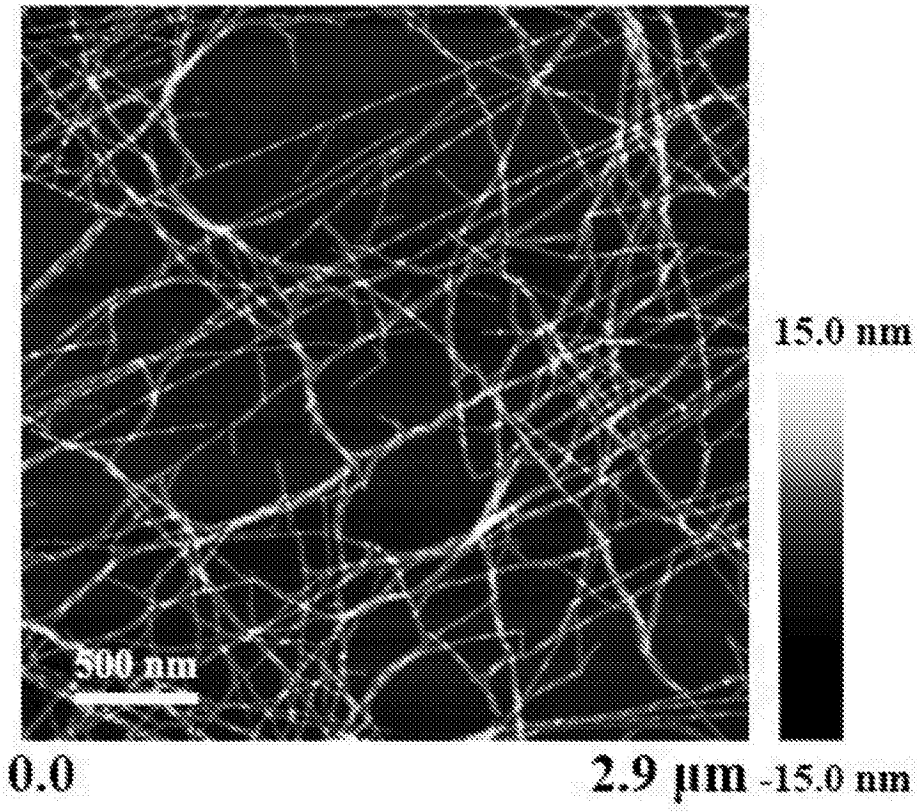


图3

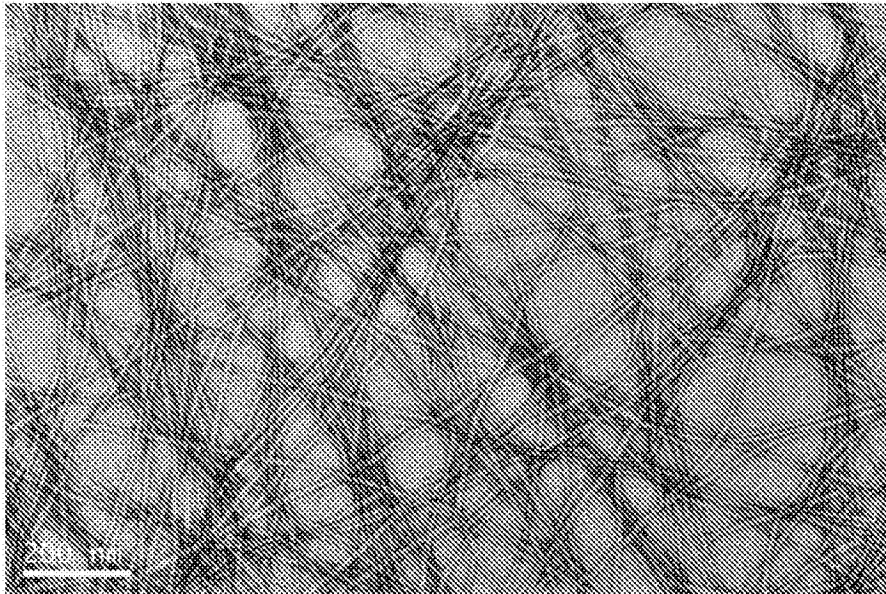


图4

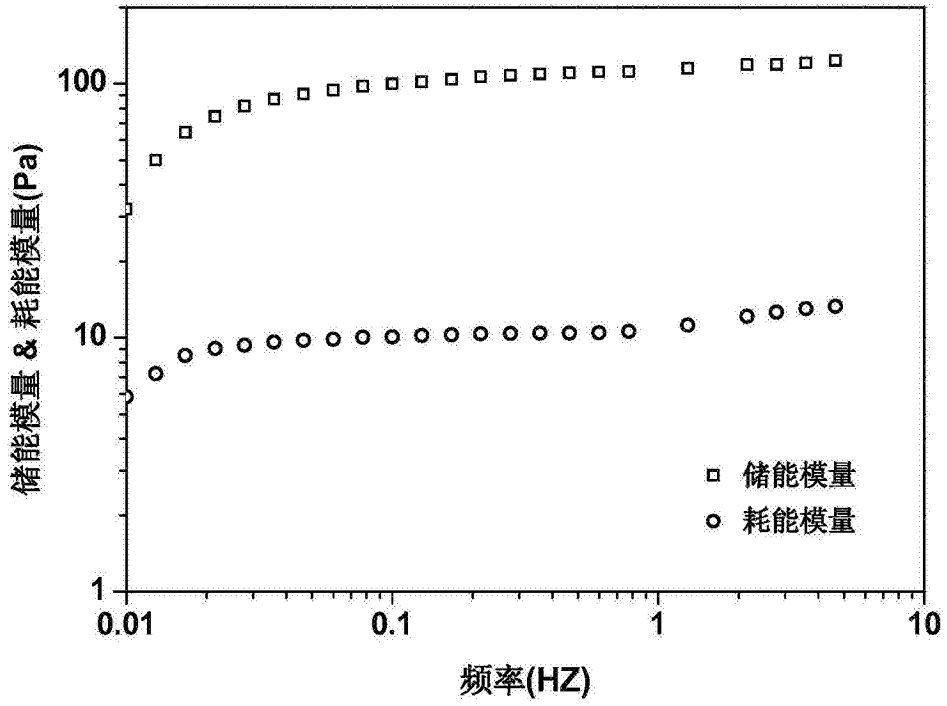


图5

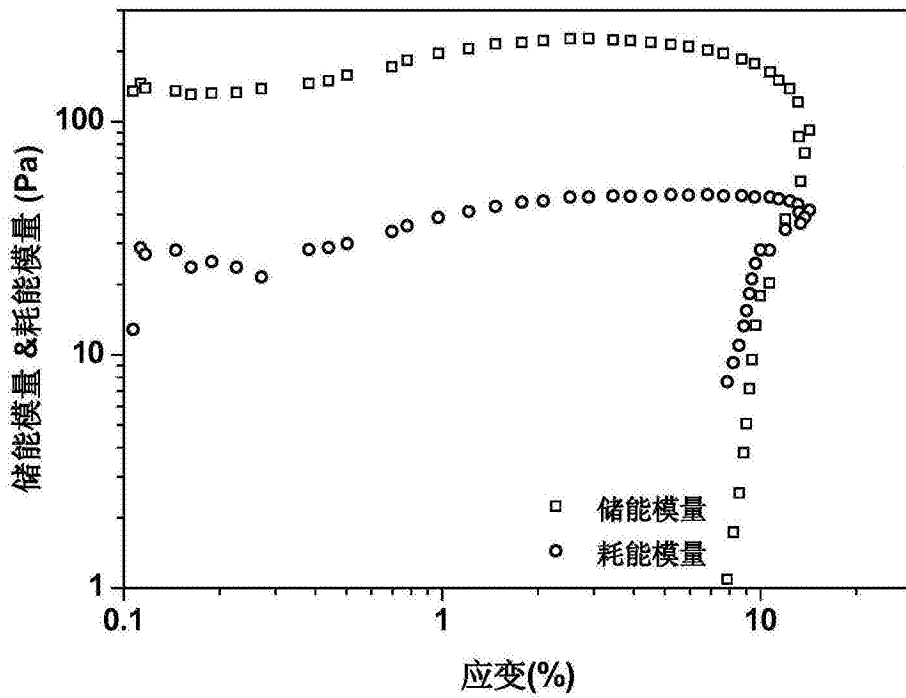


图6

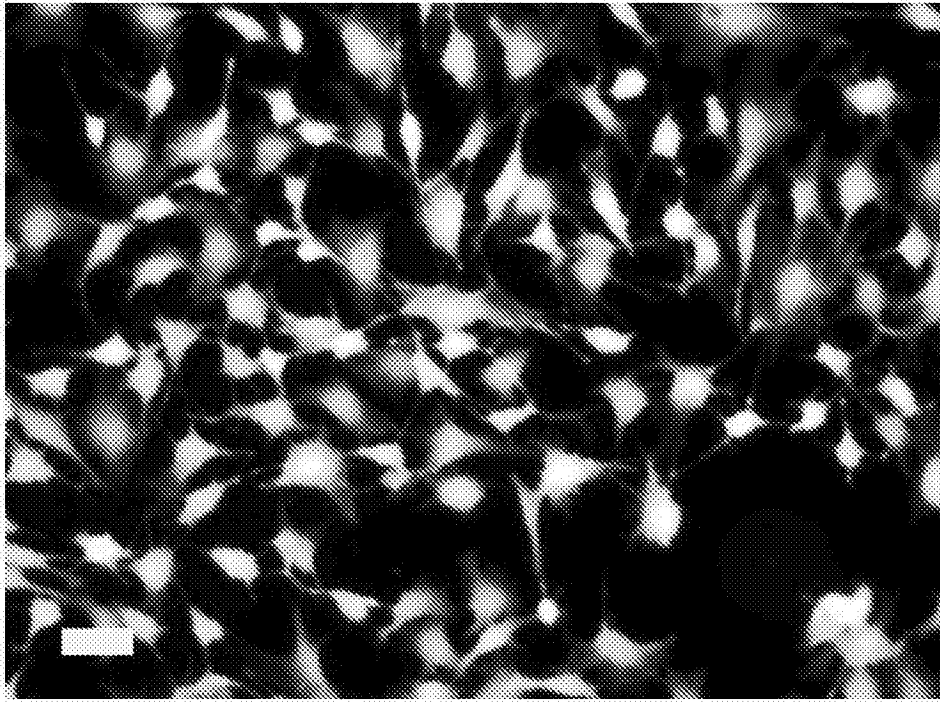


图7

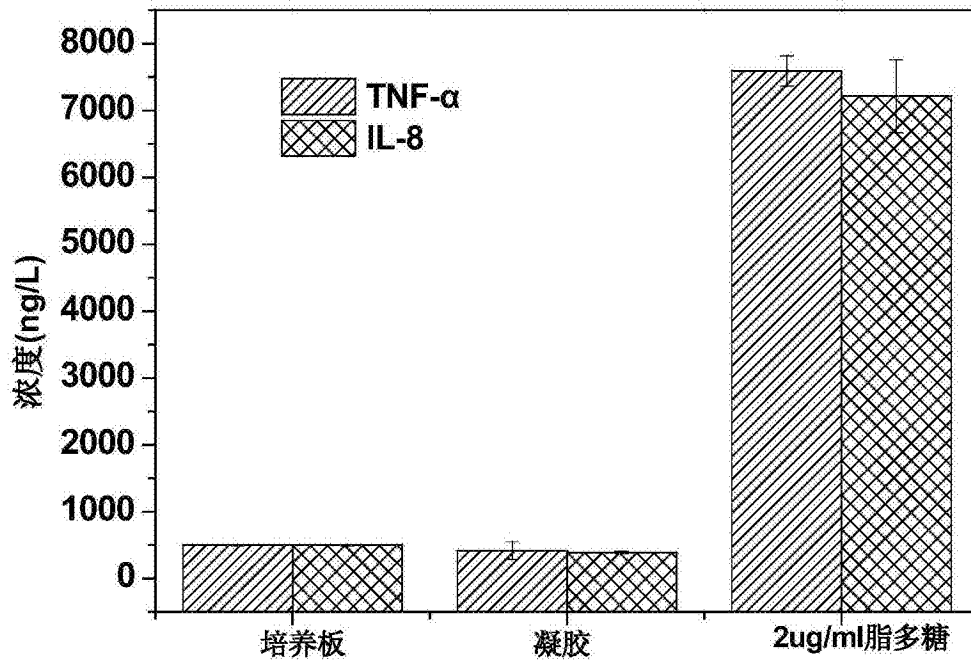


图8