



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105669832 B

(45)授权公告日 2019.02.26

(21)申请号 201610165810.1

(22)申请日 2016.03.22

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105669832 A

(43)申请公布日 2016.06.15

(73)专利权人 中国石油大学(华东)  
地址 266580 山东省青岛市经济技术开发区  
区长江西路66号

(72)发明人 陈翠霞 徐海 张宇

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C12N 5/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 105363070 A,2016.03.02,

CN 105268021 A,2016.01.27,

Joel H. Collier et al..Enzymatic  
Modification of Self-Assembled Peptide  
Structures with Tissue Transglutaminase.  
《Bioconjugate Chem.》.2003,第14卷(第4期),  
第748页右栏第2段,第753页右栏倒数第1段至第  
754页右栏第1段.

张宇等.利用基质金属蛋白酶-2 水解肽自  
组装水凝胶.《中国化学会第十五届胶体与界面  
化学会议论文集(第一分会)》.2015,第72页第1-  
2段.

审查员 段珊

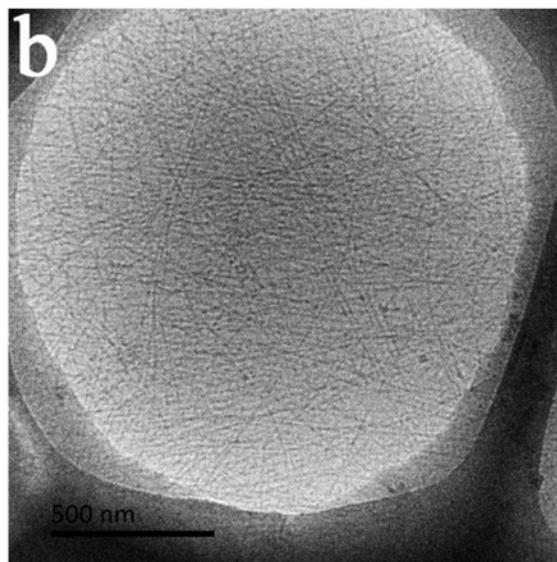
权利要求书1页 说明书4页  
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种制备水凝胶的多肽及其制备的水凝胶

(57)摘要

本发明提供一种制备水凝胶的多肽,其氨基酸序列为SEQ ID NO:1;本发明的多肽用于制备水凝胶;制备的水凝胶可用于制备细胞培养支架。本发明的多肽在生理条件下,利用生物体自身的酶进行催化,形成水凝胶,避免了外加化学剂、紫外光等对组织的伤害。且可利用生物酶进行降解,实现了通过生物体内源性物质对凝胶的降解,避免了引入外源化学剂造成的潜在毒性和免疫原性风险;是一类较为理想的组织工程材料,对人类生命健康具有重要意义。



1. 一种多肽,其特征在于,所述的多肽的其氨基酸序列为SEQ ID NO:1。
2. 如权利要求1所述的多肽,其特征在于,所述的多肽的N端进行了乙酰化,C端进行氨基化。
3. 权利要求1或2所述的多肽在制备水凝胶中的应用。
4. 一种水凝胶,其特征在于,所述的水凝胶是将权利要求2所述的多肽在pH为7~8的缓冲溶液中加热并冷却,然后加入谷氨酰胺转氨酶,37℃孵育后形成水凝胶。
5. 如权利要求4所述的水凝胶,其特征在于,所述的缓冲溶液为Hepes溶液。
6. 如权利要求4所述的水凝胶,其特征在于,所述的谷氨酰胺转氨酶加入浓度为0.1~20U/mL。
7. 如权利要求4所述的水凝胶,其特征在于,所述的多肽的添加浓度为4-32mM。
8. 权利要求4所述的水凝胶在制备细胞培养支架中的应用。
9. 一种降解权利要求4所述的水凝胶的方法,其特征在于,是用基质金属蛋白酶-II来降解。
10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述的基质金属蛋白酶-II的使用浓度为25~500ng/mL。

## 一种制备水凝胶的多肽及其制备的水凝胶

### 技术领域

[0001] 本发明涉及的水凝胶的制备技术领域,具体涉及一种制备水凝胶的多肽及其制备的水凝胶。

### 背景技术

[0002] 现有技术制备水凝胶可分为大分子交联和小分子自组装两类。小分子合成较为容易,但由于其结构为人工设计、形成凝胶的利用的均为次级键作用力,造成了凝胶降解困难,形成的凝胶强度有限。高分子凝胶具备制备简单、结构易控、强度可观的特点,但难以实现生物降解;同时难以实现对细胞特定功能的调控。目前采用的高分子材料如几丁质、海藻酸钠、胶原蛋白或经化学修饰的合成高分子如聚乙二醇等,这类高分子材料具备良好的支撑性,但在合成中的化学残留、自由基引发剂、紫外线等问题限制了其广泛应用。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种制备水凝胶的多肽及其制备的水凝胶,从而弥补现有技术的不足。

[0004] 本发明首先提供一种制备水凝胶的多肽,其氨基酸序列为IIIISLKGQ (SEQ ID NO: 1);

[0005] 上述多肽的N端进行了乙酰化,C端进行氨基化;

[0006] 上述的多肽用于制备水凝胶;

[0007] 本发明还提供一种水凝胶,其制备方法如下:将结构式为Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>的多肽在pH为7~8的缓冲溶液中加热并冷却,然后加入谷氨酰胺转氨酶,37℃孵育24小时后形成水凝胶。

[0008] 所述的缓冲溶液,优选为Hepes溶液;

[0009] 所述的谷氨酰胺转氨酶加入浓度范围为0.1U/mL至20U/mL,优选为0.9U/mL;

[0010] 短肽的添加浓度为4-32mM,优选为8mM;

[0011] 一种降解上述水凝胶的方法,是加入基质金属蛋白酶-II;

[0012] 使用的基质金属蛋白酶-II浓度为25ng/mL至500ng/mL,优选浓度为100ng/mL。

[0013] 上述制备的水凝胶在制备细胞培养支架中的应用。

[0014] 本发明的多肽在生理条件下,利用生物体自身的酶进行催化,形成水凝胶,避免了外加化学剂、紫外光等对组织的伤害。且可利用生物酶进行降解,实现了通过生物体内源性物质对凝胶的降解,避免了引入外源化学剂造成的潜在毒性和免疫原性风险;是一类较为理想的组织工程材料,对人类生命健康具有重要意义。

### 附图说明

[0015] 图1是Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>分子经基质金属蛋白酶-II降解后的基质辅助激光解吸电离分型时间质谱图;

[0016] 图2是本发明Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>分子加入谷氨酰胺转氨酶后所形成水凝胶的原子力显微镜形貌图；

[0017] 图3是本发明Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>分子加入谷氨酰胺转氨酶前的原子力显微镜形貌图；

[0018] 图4是本发明Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>分子经基质金属蛋白酶-II降解前水凝胶的机械强度(储能模量G'与耗能模量G'')与应力之间的关系；

[0019] 图5是本发明Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>分子形成的水凝胶经基质金属蛋白酶-II降解后的机械强度(储能模量G'与耗能模量G'')与应力之间的关系；

[0020] 图6是本发明Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>分子形成的水凝胶经基质金属蛋白酶-II降解后的原子力显微镜扫描图。

### 具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

[0022] 首先对本发明实施例中具体选用的主要实验仪器的规格、型号做简要说明,下列实验仪器均可通过商业渠道购买获得:

[0023] 微波辅助多肽合成仪(CEM公司,Liberty1型),

[0024] 高效液相色谱仪(Waters公司2695型分离单元,配备Waters2996型二极管阵列检测器),

[0025] 低温透射电子显微镜(Cryo-TEM,JEOL1400Plus型,日本电子公司,日本),

[0026] 原子力显微镜(AFM,Multimode VIII型,布鲁克公司,德国),

[0027] 旋转流变仪(Haake Mars III型,热电公司,美国),

[0028] 台式离心机(艾本德福公司,德国),

[0029] 二氧化碳细胞培养箱(Heracell 150i型,热电公司,美国),

[0030] 超净工作台(Airtech型,江苏安泰公司),

[0031] 培养级倒置显微镜(TS100型,尼康公司,日本),

[0032] 荧光倒置显微镜(DMI3000B型,莱卡公司,德国),

[0033] 一次性细胞培养瓶(25cm<sup>2</sup>costar型,康宁公司,美国),

[0034] 一次性移液管(5mL costar型,康宁公司,美国),

[0035] 一次性细胞培养板(3599型,康宁公司,美国),

[0036] 一次性细胞培养板(3548型,康宁公司,美国),

[0037] 液氮容器(YDS-30-125型,东亚液氮容器公司)。

[0038] 检测Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>在Tris-HCl缓冲液中的自组装形貌检测(AFM,Cryo-TEM)方法,具体检测方法如下:

[0039] AFM扫描:取2μL配好的多肽样品滴加在干净的单晶硅片表面上,迅速滴加300μL超纯水,吸附10s,然后高纯氮气吹干样品,AFM显微镜下以轻敲模式(tapping mode)完成扫描,扫描角度为0°,扫描速率1~1.5Hz,探针为TESP-V2型硅探针(布鲁克公司,德国),针尖半径约为10nm,振臂长127μm,弹性系数42N/m,同一样品在不同位置扫描5次,其结果显示,Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>、Ac-I<sub>3</sub>SLKGG-NH<sub>2</sub>在Tris-HCl缓冲液中的自组装形成纳米纤维结构,如图2所示。

[0040] Cryo-TEM:吸取10μL多肽溶液滴加在微栅表面,吸附6s后吸去表面液体,迅速浸没

入液态乙烷中,冷冻5min后保存于液氮中,之后使用透射电子显微镜观察。结果显示,通过透射电子显微镜观察到两个多肽样品在Tris-HCl缓冲溶液中均体现为纤维结构,与原子力显微镜观察到的一致,如图3所示。

[0041] 实施例1:

[0042] 本实施例水凝胶的制备方法,包括以下步骤:

[0043] 将多肽Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>在缓冲溶液Hepes缓冲溶液的作用下,稀释至浓度为8mM,经涡旋、超声后,置于85℃水浴中加热并冷却至室温,加入谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase, TGase),使TGase的终浓度为0.9U/mL,分别37℃孵育。24小时和15天后,能够形成水凝胶。经过流变学测试,如图4所示,Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>多肽水凝胶的储能模量G' 约为800Pa,耗能模量G'' 约为储能模量G' 的1/10,说明体系形成了典型了水凝胶。

[0044] 水凝胶降解测试:在37℃下,向自组装形成的水凝胶中加入基质金属蛋白酶II(MMP-2),使之终浓度为100ng/mL,将凝胶置于37℃水浴中孵育15天后流变学测试,发现凝胶的储能模量G' 均降低至加入基质金属蛋白酶-II之前的1/2左右,如图5所示。说明水凝胶逐渐被基质金属蛋白酶-II降解。将降解后凝胶以基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱表征,结果显示有预期的分子片段生成,证明了降解过程的发生,如图1所示。对降解后的凝胶进行原子力显微镜扫描,结果显示,凝胶中纤维减少,证明了降解过程的发生,如图6所示。

[0045] 实施例2:

[0046] Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>凝胶的制备方法:

[0047] 选取前述固相合成法制备的短肽Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>在Hepes缓冲液的作用下,稀释为浓度为8mM,震荡超声后,置于85℃水浴中加热2小时,自然冷却至室温,加入溶解在Hepes缓冲液中并含有5mM CaCl<sub>2</sub>和2mM二硫苏糖醇(DTT)的谷氨酰胺转氨酶,使酶最终作用浓度为0.9U/mL,短肽最终浓度为7.27mM。将所得溶液置于37℃水浴中孵育24小时,可得到能够倒立自支撑的水凝胶。

[0048] 对实施例2中的凝胶进行测定:

[0049] 吸取20μL Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>凝胶,滴加于洗净的硅片上,之后迅速加入300μL超纯水,静置吸附10s后,氮气吹干样品,AFM扫描,发现形成凝胶后,纳米纤维的结构保持不变,如图2所示。吸取10μL多肽溶液滴加在微栅表面,吸附6s后吸去表面液体,迅速浸入液态乙烷中,冷冻5min后保存于液氮中,之后使用透射电子显微镜观察。结果显示,通过透射电子显微镜观察到多肽样品在Hepes缓冲溶液中为纤维结构,与原子力显微镜观察到的一致,如图3所示。

[0050] 在Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>凝胶形成24小时后,在水凝胶上方加入NIH-3T3细胞,在37℃,5%CO<sub>2</sub>环境中培养15天后,显微镜观察显示,NIH-3T3细胞部分进入内部,为人造组织的研发提供了实验思路。

[0051] 实施例3:

[0052] 采用哈克流变仪表征Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>水凝胶样品的机械性能(粘弹性),采用直径为35mm锥度为2°的锥板为转子,采用35mm直径的平板为定子,每次测量使用样品体积为400μL,实验温度恒定为25℃,以1Hz频率进行应力扫描,扫描范围为0.01%至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进行动态频率扫描,扫描范围为0.01Hz至

100Hz, 研究储能模量 $G'$ 和耗能模量 $G''$ 之间的关系。

[0053] 将Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>在Hepes缓冲液作用下稀释至浓度为8mM, 按照实施例2的方法加入谷氨酰胺转氨酶, 静置于37°C水浴24小时, 然后取400 $\mu$ L在1Hz频率作用下进行0.01%至100%的应力扫描, 实验结果如图4所示, 水凝胶的储能模量 $G'$ 约为800Pa。

[0054] 采用本例中方法, 测量加入100ng/mL的基质金属蛋白酶-II并37°C孵育15天后的水凝胶, 应力扫描结果显示其储能模量 $G'$ 约为400Pa左右, 降低至加入基质金属蛋白酶-II前的一半。

[0055] 实施例4:

[0056] 按照实施例2中的方法制备Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>水凝胶, 并向其中加入100ng/mL终浓度的基质金属蛋白酶-II, 37°C孵育15天后, 吸取20 $\mu$ L Ac-I<sub>3</sub>SLKGQ-NH<sub>2</sub>凝胶, 滴加于洗净的硅片上, 之后迅速加入300 $\mu$ L超纯水, 静置吸附10s后, 氮气吹干样品, AFM扫描, 发现经过基质金属蛋白酶-II降解后, 纳米纤维的结构被破坏, 如图6所示。

[0057] 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。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国石油大学（华东）

<120> 一种制备水凝胶的多肽及其制备的水凝胶

<130>

<160> 1

[0001] <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 1

<400> 1

Ile Ile Ile Ser Leu Lys Gly Gln

1

5

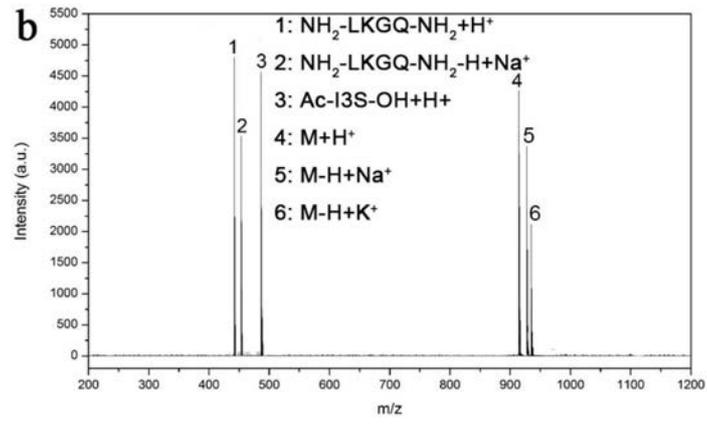


图1

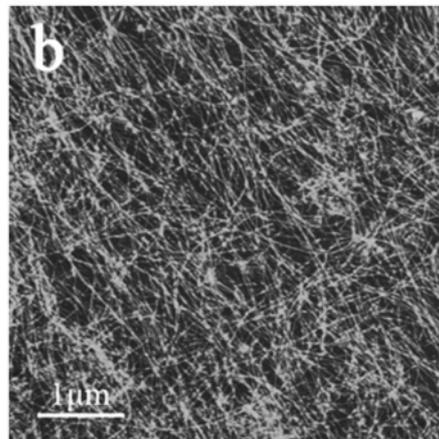


图2

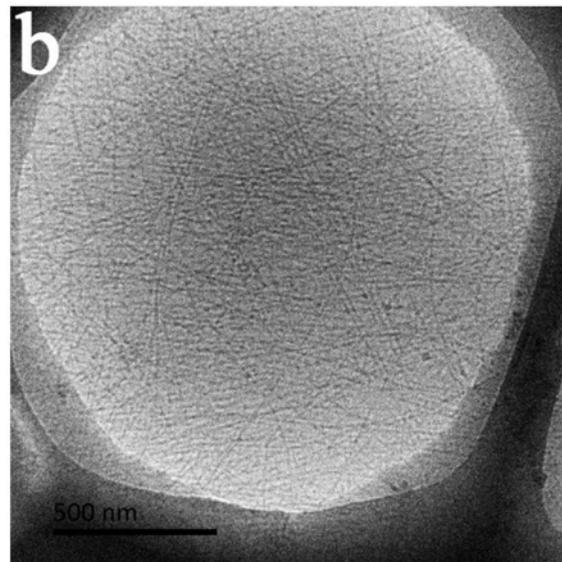


图3

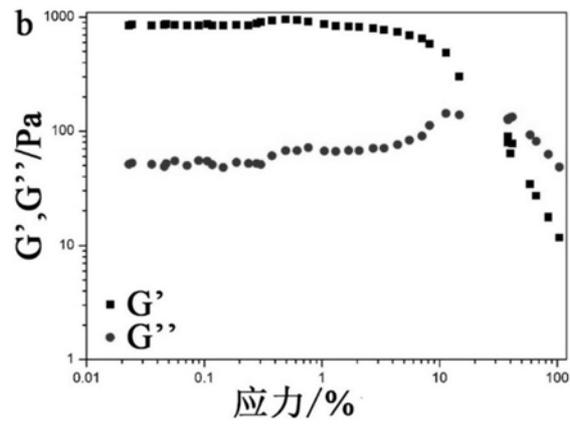


图4

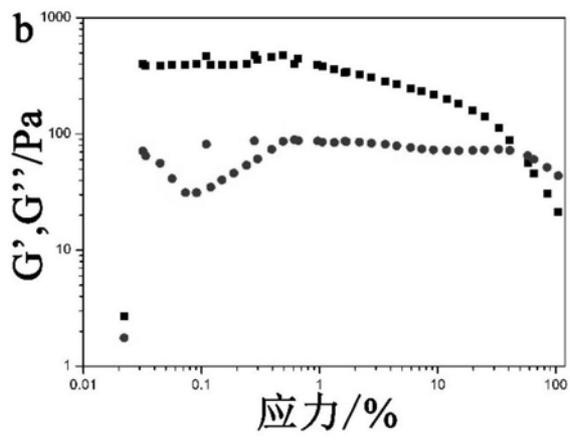


图5

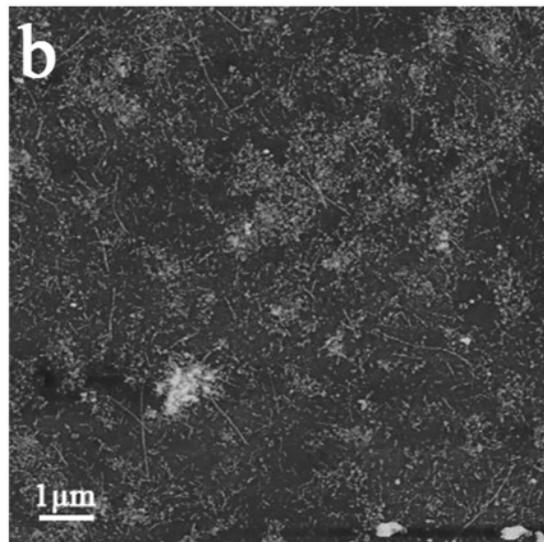


图6