



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111748042 A

(43) 申请公布日 2020. 10. 09

(21) 申请号 202010449917.5

A61K 39/39 (2006.01)

(22) 申请日 2020.05.25

A61P 31/20 (2006.01)

(71) 申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务
外环路12号7层3号

(72) 发明人 王云龙 李玉林 张怡青 王继创
王国强 程蕾 王敏 王运从

(74) 专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

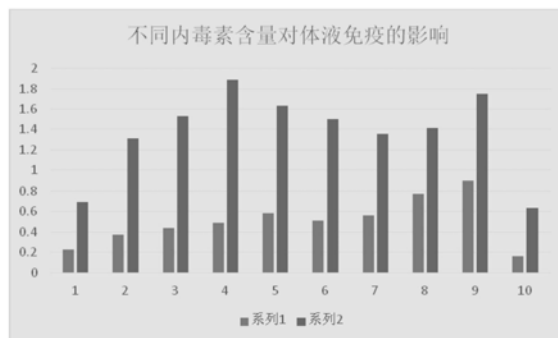
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及疫苗技术领域,具体涉及一种含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白及其制备方法和应用。本发明的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白中内毒素的含量为内毒素含量为50-12800EU/mg时,经发明人的研究发现,非洲猪瘟融合蛋白中的内毒素可起到增强体液和细胞免疫的效果,以一定程度上解决现有技术中非洲猪瘟亚单位疫苗免疫原性弱的问题。



1. 一种含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白,其特征在于,所述非洲猪瘟融合蛋白的内毒素含量为50-12800EU/mg。

2. 根据权利要求1所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白,其特征在于,所述非洲猪瘟融合蛋白的内毒素的含量为200-3200EU/mg。

3. 根据权利要求1或2所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白,其特征在于,所述非洲猪瘟融合蛋白的氨基酸序列包括下述片段:p30蛋白的至少1个中和抗原表位肽、p54蛋白的至少1个中和抗原表位肽和p72蛋白的至少1个中和抗原表位肽。

4. 根据权利要求3所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白,其特征在于,所述非洲猪瘟融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

5. 根据权利要求1-3中任意一项所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白的制备方法,其特征在于,采用基因工程的方法制备所述非洲猪瘟融合蛋白,破碎表达所述非洲猪瘟融合蛋白的工程菌并收集上清液后,依次采用镍亲和层析和DEAE层析纯化所述非洲猪瘟融合蛋白。

6. 根据权利要求5所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白的制备方法,其特征在于,所述镍亲和层析时,依次用含50、100、200、300、400mmol/L咪唑的PB洗脱;以紫外分光光度计测流出液在280nm波长处的吸光度值,一个浓度的流出液 $OD_{280} \leq 0.1$ 时换下一个浓度的咪唑洗脱。

7. 根据权利要求5所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白的制备方法,其特征在于,所述DEAE层析时选用含有100mM-200mM NaCl的PB溶液除杂,选用含有1-5M NaCl的PB溶液洗脱以纯化得到所述含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白;以紫外分光光度计测流出液在280nm波长处的吸光度值,一个浓度的流出液 $OD_{280} \leq 0.1$ 时换下一个浓度的咪唑洗脱。

8. 一种非洲猪瘟疫苗,其特征在于,所述非洲猪瘟疫苗的原料或有效成分包括如权利要求1-4中任意一项所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白。

9. 根据权利要求1-4中任意一项所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白的用途,其特征在于,所述含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白在制备单克隆抗体、多克隆抗体、非洲猪瘟检测测试纸条、检测卡或检测试剂盒中的应用。

一种含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及疫苗技术领域,具体涉及一种含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 当前,在非洲猪瘟疫苗的研发主要集中于通过选用p30、p54、p72、CD2v、p12、p54、p17和p30等常见的具有稳定免疫原性的蛋白来制备安全性较好的亚单位疫苗。但制备得到的亚单位疫苗的免疫原性相对较弱,不易引发细胞免疫反应,影响疫苗的使用效果。例如,文献《Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation》(Sandra等,《Vaccine》32(2014)3879-3882)的研究表明非洲猪瘟疫苗单加入B细胞激活剂表现出抗体依赖性增强(ADE)。该研究共包括15只大约八周龄的杂种断奶仔猪。用感染猪外周血进行灭活苗制备,以三周的间隔两次免疫六只断奶仔猪。第一次免疫六周后,用高毒力的ASFV同源物攻击动物。尽管在攻击前除了一只疫苗接种的动物以外,其他所有动物中均可检测到ASFV特异性抗体,但未观察到免疫的保护作用。所有动物均发展为急性致死性ASF,疫苗接种者的临床进程略有加速甚至可能表明抗体依赖性增强。

[0003] 因此,既能刺激B细胞又能刺激T细胞的佐剂在该非洲猪瘟研发中显得尤为重要。

[0004] 微生物作为佐剂既能刺激B细胞又能刺激T细胞很早之前就有报道。20世纪50年代,革兰氏阴性菌的脂多糖被证实具有免疫佐剂的功效。革兰氏阴性细菌的外膜普遍含有脂多糖(Lipopolysaccharides,LPS),俗称内毒素(Endotoxin)在哺乳动物或人体细胞中存在对细菌LPS特异性的级联识别信号通路,皮摩尔级的LPS便能激活先天性免疫反应。使免疫系统迅速被激活,使免疫应答增强,使抗原连续释放的时间延长等,从而对提升疫苗对机体的免疫效果具有非常重要的价值。

[0005] LPS的免疫识别机制是LPS被体液中的LPS结合蛋白(LPS binding protein,LBP)结合,由LBP帮助呈递到免疫细胞表面,或直接扩散到免疫细胞表面,在辅助蛋白CD14和MD-2的作用下,被宿主免疫细胞表面的Toll样受体4(Toll like receptor 4,TLR4)所识别,激活细胞内一系列信号转导通路,最终诱导各种促炎性细胞因子的释放,有助促进机体快速清除病原、产生免疫应答,可作为免疫系统激活剂从而被开发成内毒素疫苗佐剂。

[0006] 但由于LPS的多糖长链部分结构多异,无法制定出标准化提取方法;又由于LPS分子量大,在质谱检测时难以离子化,不能实现实时检测和定量,在临床研究的给药控制和体内药物代谢物分析方面也存在很大局限性。目前,LPS作为内毒素佐剂只运用于动物疫苗体系,如某些沙门氏菌LPS佐剂有利于预防致病沙门氏菌引起的动物疾病等。

发明内容

[0007] 本发明提供一种含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白,经发明人的研究发现,非洲猪瘟融合蛋白中的内毒素可起到增强体液和细胞免疫的效果,且在较高含量时仍能保证非洲

猪瘟融合蛋白的安全性,以解决现有技术中非洲猪瘟亚单位疫苗免疫原性弱的问题。

[0008] 本发明的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白采用如下技术方案:一种含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白,所述非洲猪瘟融合蛋白的内毒素含量为50-12800EU/mg。

[0009] 优选的,所述非洲猪瘟融合蛋白的内毒素的含量为200-3200EU/mg。非洲猪瘟融合蛋白的内毒素含量在200-3200EU/mg时,不仅可起到加强非洲猪瘟融合蛋白的体液和细胞免疫效果的作用,而且安全性更好,可有效避免被免疫动物出现高烧等不良反应。

[0010] 优选的,所述非洲猪瘟融合蛋白包括下述片段:p30蛋白的至少1个中和抗原表位肽、p54蛋白的至少1个中和抗原表位肽和p72蛋白的至少1个中和抗原表位肽。当非洲猪瘟融合蛋白的具有如上所述的片段时,体液免疫和细胞免疫的效果较好。

[0011] 优选的,所述非洲猪瘟融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0012] 本发明的第二目的在于提供如上述任意一项所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白的制备方法,具体技术方案为:采用基因工程的方法制备所述非洲猪瘟融合蛋白,破碎表达所述非洲猪瘟融合蛋白的工程菌并收集上清液后,依次采用镍亲和层析和DEAE层析纯化所述非洲猪瘟融合蛋白。其中,表达系统优选原核表达系统,如以大肠杆菌为工程菌来表达上述非洲猪瘟融合蛋白。

[0013] 优选的,所述镍亲和层析时,依次用含50、100、200、300、400mmol/L咪唑的PB洗脱。

[0014] 优选的,所述DEAE层析时选用含有100mM-200mM NaCl的PB溶液除杂,选用含有1-5MNaCl的PB溶液洗脱以纯化得到所述含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白。

[0015] 本发明的第3个目的在于提供一种非洲猪瘟疫苗,具体技术方案为:所述非洲猪瘟疫苗的原料或有效成分包括如上述任意一项所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白。应当说明的是,除所述非洲猪瘟融合蛋白外,所述疫苗还可包括赋形剂,载体或稀释剂等成分。进一步的,任选地包含一种或多种合适的佐剂,例如:201佐剂(法国赛比克公司)、化学类免疫佐剂如氢氧化铝、弗氏佐剂、矿物油、司盘等;微生物类免疫佐剂如分枝杆菌、BCC、脂多糖、胞壁酰二肽、胞肽、脂溶性蜡质D、短小棒状杆菌;植物类免疫佐剂多为从植物或大真菌中提取的多糖类,如茯苓多糖、红花多糖、中草药类等。

[0016] 本发明的目的还在于提供了如上述任意一项所述的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白的用途,具体技术方案为:所述含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白在制备单克隆抗体、多克隆抗体、非洲猪瘟检测试纸条、检测卡或检测试剂盒中的应用。

[0017] 本发明的有益效果是:本发明的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白的体液免疫和细胞免疫的效果均更好。

[0018] 本发明的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白的安全性好,在200-3200EU/mg的范围内均不会引发高烧等不良反应。

[0019] 本发明的含有内毒素的非洲猪瘟融合蛋白的制备方法简单、高效。

附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0021] 图1为不同内毒素含量对体液免疫的影响检测结果图;其中:系列1是指实验的第14天前腔静脉采血检测的结果,系列2是指实验的第28天前腔静脉采血检测的结果。

[0022] 图2为不同内毒素含量对细胞免疫的影响检测结果图;系列1是指实验的第14天外周血淋巴细胞检测的结果,系列2是指实验的第28天外周血淋巴细胞检测的结果。

具体实施方式

[0023] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0024] 实施例1

[0025] 1.1非洲猪瘟融合蛋白的氨基酸序列-SEQ ID NO.1:

[0026] MTKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAEENMILHVLFEETESSASSEN
IHEKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGKAPDFKKTIIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPV
TTSPFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPATNK
PVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTHKDLENSLKKMASGGAFCLI
ANDGKADKIKKNVNSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYENKVRPHTGTPTLGKLTFGIPQYGF
FHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGE
RLKKVSVEGTSGPLL CNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKT
YQRTRALVGSSSSGSSSGHHHHHHHHH

[0027] 1.2将SEQ ID NO.1提供给生工生物(上海)股份有限公司,由该公司按照氨基酸序列合成编码SEQ ID NO.1的核苷酸序列,并将合成的核苷酸序列转化入pET28a-ASFV质粒。

[0028] 1.3重组蛋白的表达

[0029] 采用CaCl₂法制备感受态细胞,将构建成功的pET28a-ASFV质粒导入BL21(DE3)感受态细胞内,制备出重组菌,并利用质粒上的卡那霉素(Kana)抗性基因,采用加有卡那霉素的选择性培养基筛选阳性重组菌。首先根据本实验室现有重组蛋白表达的成熟条件,对重组菌进行初步诱导表达,并通过SDS-PAGE凝胶电泳和Western blot对表达的重组蛋白进行鉴定。

[0030] 1.3.1表达条件的优化:取鉴定结果符合预期的菌,采用单因素变量法,对重组蛋白表达的诱导剂IPTG浓度、诱导时间及诱导温度进行优化,根据优化出的最优条件进行大样诱导表达。

[0031] 1.3.1.1优化诱导剂浓度:以单因素变量为原则,诱导温度为37℃,诱导时间为4h,诱导剂IPTG浓度设置为0mmol/L(对照)、0.3mmol/L、0.7mmol/L、1.0mmol/L、1.5mmol/L、2.5mmol/L共六个水平。分别检测各水平组重组蛋白表达量,优选出最优的诱导剂浓度为1.0mmol/L。

[0032] 1.3.1.2优化诱导时间:以单因素变量为原则,诱导温度为37℃,选择最优的诱导剂浓度,诱导时间设置为2h、4h、6h、8h共四个水平,分别检测各水平组重组蛋白表达量,优选出最优的诱导时间6h。

[0033] 1.3.1.3优化诱导温度:以单因素变量为原则,选择最优的诱导时间及最优的诱导

剂浓度,诱导温度设置为25℃、30℃、37℃共三个水平,分别检测各水平组重组蛋白表达量,优选出最优的诱导温度37℃。

[0034] 具体步骤如下:感受态大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞的制备:取一大肠杆菌BL21 (DE3) 单菌落于2ml LB培养基中,37℃、200rpm速度振荡培养12-16小时,取1ml培养物接种于100ml LB培养基中,37℃、200rpm速度培养3小时;将菌液冰浴2小时,然后2500g、低温离心20分钟,收集菌体;加入100ml冰冷的Trituration缓冲液(100mmol/L CaCl₂,70mmol/L MgCl₂,40mmol/L醋酸钠,PH5.5),混匀,置冰浴45分钟,1800g低温离心15分钟,弃上清,加入10ml冰冷Trituration缓冲液悬浮细胞,按每份200μl分装,-70℃保存备用。

[0035] 转化:将200μl感受态细胞置冰上融化,然后加入3μl DMSO,混匀,加入2μl连接反应液,再次混匀,置冰上30分钟,42℃45秒,然后迅速放回冰浴1.5分钟,加入2ml LB培养液,37℃、200rpm振荡培养1小时,4000g低温离心10秒钟弃上清,用200μL LB培养基重悬菌体;将菌液铺于含有氨苄青霉素抗性的LB琼脂培养板上,涂匀,室温放置30分钟,倒置于37℃恒温箱中培养12-16小时。筛选平板上的克隆,提取质粒,EcoR I和HindI I I双酶切,可以切出相应编码非洲猪瘟融合蛋白基因大小的片段初步确定为阳性克隆。

[0036] 诱导表达:即将阳性克隆过夜培养,次日早上按1:100转接,培养3小时后,加入1mM IPTG,37℃继续培养6小时,制备样品;常规SDS—PAGE检测目的蛋白表达分子量处见到特异性条带为正确克隆;取正确克隆,放大培养,SDS—PAGE证实表达正确后,将目标蛋白纯化后使用常规western—blot进一步证实其表达准确性。

[0037] 1.4重组菌蛋白的纯化

[0038] (1) 菌体收集及裂解

[0039] 参照优化结果,以最佳诱导条件(37℃、以1.0mmol/L的IPTG诱导6h)诱导表达。将诱导后的菌液10000rpm,离心10min,弃去培养基,加入200mL PB(0.05mmol/L,pH 7.8)洗沉淀二次,再用100mL PB(0.05mmol/L,pH 7.8)冰浴条件下超声波800V,破菌5s,间歇5s,循环99次。将菌全液10000rpm,离心10min,取上清进行纯化。

[0040] (2) 镍亲和层析纯化

[0041] 1) 镍亲和层析柱准备:将再生后的镍亲和层析柱用0.05mol/L pH 7.8的PB平衡至流出液的pH与缓冲液pH相同。

[0042] 2) 上样:用恒流泵将处理好的样品泵入镍亲和层析柱,控制恒流泵转速为10~15转/分钟。

[0043] 3) 洗脱:依次用含50、100、200、300、400mmol/L咪唑的PB(0.05mol/L,pH 7.8)洗脱,以紫外分光光度计测流出液在280nm波长处的吸光度值(OD₂₈₀)。一个浓度的流出液OD₂₈₀≤0.1时换下一个浓度的咪唑洗脱。收集流出液,用相应浓度洗脱液调零后检测流出液的OD₂₈₀并记录。

[0044] 4) 蛋白浓度测定:测定OD₂₈₀及OD₂₆₀,依据公式计算蛋白质浓度(mg/mL)=1.45×OD₂₈₀-0.74×OD₂₆₀。

[0045] 经计算,每升发酵液中的重组工程菌经镍亲和层析纯化后可获得蛋白180-290mg。

[0046] (3) DEAE层析纯化

[0047] 1) DEAE层析柱准备:将再生后的DEAE层析柱用0.05mol/L pH 7.8的PB平衡至流出液的pH与缓冲液pH相同。

[0048] 2) 上样:用恒流泵将处理好的样品泵入层析柱,控制恒流泵转速为10~15转/分钟。

[0049] 3) 洗脱:依次用含100mM、200mM、2000mM的NaCl的PB(0.05mol/L, pH 7.8)洗脱,以紫外分光光度计测流出液在280nm波长处的吸光度值(OD₂₈₀)。一个浓度的流出液OD₂₈₀≤0.1时换下一个浓度的咪唑洗脱。收集流出液,用相应浓度洗脱液调零后检测流出液的OD₂₈₀并记录。

[0050] 4) 蛋白浓度测定:测定OD₂₈₀及OD₂₆₀,依据公式计算蛋白质浓度(mg/mL)=1.45×OD₂₈₀-0.74×OD₂₆₀。

[0051] 经计算,经DEAE层析纯化后蛋白回收率为75-83%之间,采用内毒素试剂盒对每批产品中的内毒素含量进行定量,按照上述方法纯化得到的非洲猪瘟融合蛋白中每毫克蛋白内毒素含量4000-8000之间。若需进一步减少非洲猪瘟融合蛋白中内毒素的含量,可根据后续实验需要再次重复DEAE层析纯化步骤,以获得理想的内毒素浓度。

[0052] 实施例3

[0053] 制备非洲猪瘟疫苗:取7号白油1128毫升,再加入司盘-80 720毫升,混匀;再称取硬脂酸铝24克,将上述试剂用胶体磨充分溶解后混匀并高压灭菌,即为油相。将实施例2纯化得到的非洲猪瘟融合蛋白无菌过滤后用无菌的生理盐水无菌稀释为0.6mg/ml,取该溶液500ml加入上述无菌油相1000毫升,10000r/min搅拌2-5min,得到非洲猪瘟疫苗,备用。

[0054] 实施例4将实施例3制备得到的非洲猪瘟疫苗用于免疫动物

[0055] 4.1免疫方法:将30头猪分为10组进行免疫,采用耳后颈部肌肉注射,在左右双耳分别注射0.5mL实施例3制备得到的非洲猪瘟疫苗;共免疫两次,每次间隔14天(第1天和第15天分别进行第一次免疫和第二次免疫),第14、28天分别前腔静脉采血,用于后续检测。

[0056] 分组情况:试验组共9组,每组3头猪;对照组1组,3头猪;不同组的猪分别以采用含有不同内毒素含量的非洲猪瘟融合蛋白制成的非洲猪瘟疫苗来免疫,具体分组情况见下表1:

[0057] 表1

[0058] 组别	1	2	3	4	5
内毒素含量	50	100	200	400	800
组别	6	7	8	9	10
内毒素含量	1600	3200	6400	12800	<10

[0059] 备注:上表1中内毒素的含量为用于制备疫苗的非洲猪瘟融合蛋白的内毒素含量,单位为EU/mg。

[0060] 实验现象:在首次免疫后前三天观察中发现:内毒素含量是12800的组(第9组)出现高烧,持续时间3天;内毒素含量是6400的组(第8组)出现高烧,持续时间1天;内毒素含量是3200以下的各组均未出现发烧等不良反应。

[0061] 在第二次免疫后前三天观察中发现:内毒素含量是12800的组(第9组)出现高烧,持续时间5天;内毒素含量是6400的组(第8组)出现高烧,持续时间2天;内毒素含量是3200以下的各组均为出现发烧等不良反应。

[0062] 4.2检测不同组疫苗对体液免疫的影响

[0063] 将上述不同实验组所用到的非洲猪瘟融合蛋白作为抗原用pH9.5 0.05mol/L CB

稀释至0.1 μ g/ml, 100 μ l/孔加入酶板反应板, 4 $^{\circ}$ C包被过夜; 第二天, 洗涤液(洗涤液的pH为7.0的含有0.01mol/L PB、0.1mol/L NaCl和0.1% tween-20)洗板一次, 按115 μ l/孔加入含5%小牛血清的pH7.0、0.01mol/L PB封板, 4 $^{\circ}$ C封闭过夜; 第二天吸净封板液, 37 $^{\circ}$ C干燥1小时, 加干燥剂封装于铝箔袋中, 包被完毕。检测时在酶标反应孔中先加入50 μ l pH为7.0的含有0.01mol/L PB和0.1mol/L NaCl的PBS, 然后加入50 μ l待检血清, 阴性、阳性对照, 37 $^{\circ}$ C温育20分钟, 用洗涤液洗板五次, 拍干; 用pH7.0 PBS按照1:500的比例稀释羊抗猪酶标抗体, 100 μ l/孔加入反应板, 37 $^{\circ}$ C温育20分钟, 洗板同前, 加入显色剂A、B液各1滴, 37 $^{\circ}$ C显色10分钟, 显色剂A含H₂O₂, 显色剂B含TMB; 显色完成后, 每孔加入1滴2mol/L H₂SO₄终止反应, 用酶标仪在450nm波长读取结果。OD_{450nm}>2.1 \times 阴性对照OD平均值者为阳性, OD_{450nm}<2.1 \times 阴性对照平均值为阴性。具体检测结果如下表2和图1所示:

[0064] 表2

内毒素	组别	系列1	系列2
50	1	0.2268	0.6915
100	2	0.37364	1.31164
200	3	0.44016	1.5292
400	4	0.49084	1.8841
800	5	0.582	1.63504
1600	6	0.512	1.5012
3200	7	0.56448	1.353
6400	8	0.769	1.4112
12800	9	0.895	1.7528
<10	10	0.16128	0.63504

[0066] 备注:表2和图1中的:系列1是指第14天前腔静脉采血检测的结果, 系列2是指第28天前腔静脉采血检测的结果;内毒素含量的单位为EU/mg。

[0067] 4.3细胞免疫检测

[0068] 分别于第14天和第28天采集猪的外周血, 分离外周血淋巴细胞, 采用Biosource Europe的Swine IFN(干扰素)Cytoset ELISPOT检测试剂盒进行检测。具体步骤如下:

[0069] A. 准备工作和封闭预包被孔板

[0070] (1) 在支架上安装需要数量的孔条, 用无菌PBS (200 μ l/孔) 洗4次。剩余的孔条放在封闭袋中室温保存。

[0071] (2) 用包含10%血清(血清与悬浮细胞的血清相同)的培养基(200 μ l/孔)封闭。在室温下孵育至少30分钟。

[0072] B. 在孔板中孵育细胞

[0073] (1) 移去封闭培养基, 加入包含有抗原等可能的刺激因素的细胞悬液(终体积100~150 μ l/孔)。推荐使用试剂盒中的阳性对照, 使用终浓度为100ng/ml。

[0074] (2) 孔板放在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的增湿培养箱中赋予12~48h。孵育的时候不要移动孔板, 使用铝箔纸包裹孔板以避免水分蒸发。

[0075] C、检测斑点

[0076] (1) 排空孔板移除细胞, 用无菌PBS清洗5次, 200 μ l/孔。

[0077] (2) 用包含0.5%胎牛血清的无菌PBS按照1:200稀释一步反应检测试剂。每孔加100 μ l。室温孵育2h。

[0078] (3) 200 μ l/孔PBS清洗孔板5次。

[0079] (4) 用0.45 μ m的滤膜过滤准备使用的底物裂解液(BCIP/NBT-plus),每孔加100 μ l。显像直到斑点出现;超过15min的显影能引起背景染色。用自来水冲洗使染色反应终止。移去板缝里面的水(孔板下面的软塑料)并且清洗薄膜的背面。

[0080] (5) 晾干孔板。在显微镜(X40)或者在ELISpot计数器上检查并计数斑点。

[0081] 检测结果见下表3

[0082] 表3

[0083]

内毒素	组别	系列1	系列2
50	1	17.41	31.6
100	2	35.21	62.45
200	3	37.95	75.48
400	4	39.66	79.16
800	5	46.86	81.44
1600	6	49.39	77.95
3200	7	53.13	84.81
6400	8	56.32	79.86
12800	9	63.25	91.7
<10	10	6.1	18.8

[0084] 备注:表3和图2中的:系列1是指第14天外周血淋巴细胞检测的结果,系列2是指第28天外周血淋巴细胞检测的结果;内毒素含量的单位为EU/mg。。

[0085] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

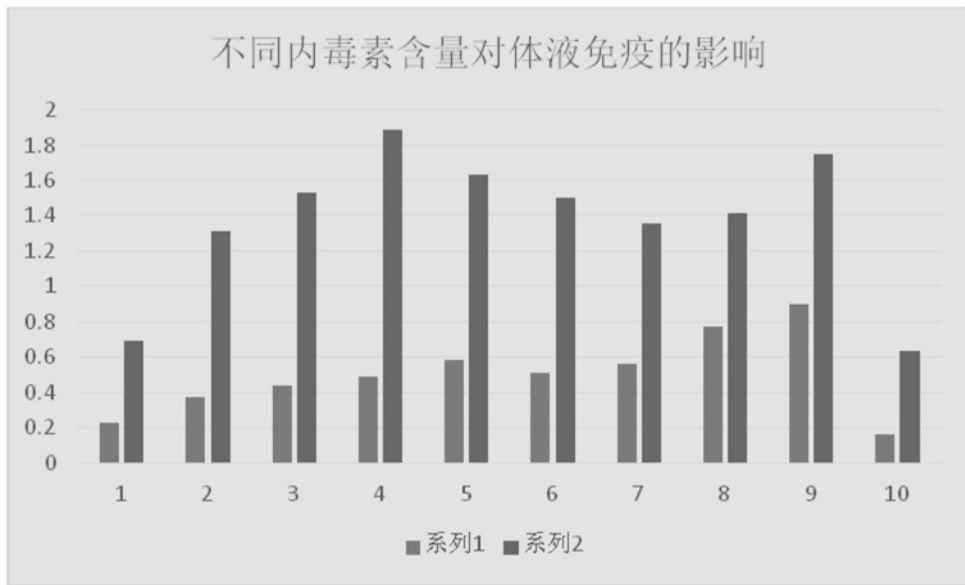


图1

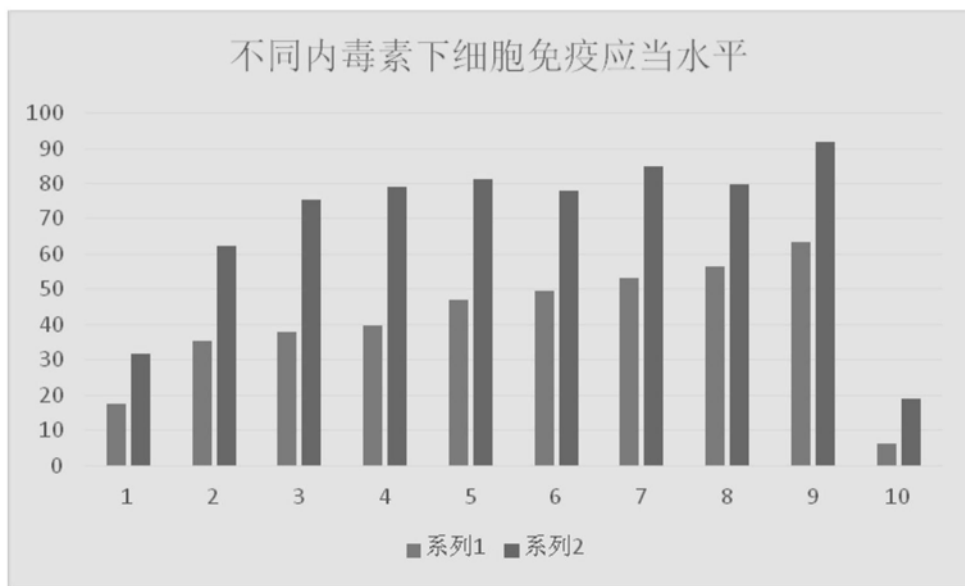


图2