



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111440229 B

(45) 授权公告日 2021.08.03

(21) 申请号 202010287172.7
 (22) 申请日 2020.04.13
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111440229 A
 (43) 申请公布日 2020.07.24
 (73) 专利权人 中国人民解放军军事科学院军事
 医学研究院
 地址 100850 北京市海淀区太平路27号
 (72) 发明人 张纪岩 李伍举 刘涛 程倩倩
 张耀林 侯春梅 董洁 王庆阳
 林周 杨锡琴
 (74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理
 有限公司 11736
 代理人 朱萍 孟祥斌

(51) Int.Cl.
 C07K 14/165 (2006.01)
 C12N 5/0783 (2010.01)
 A61K 39/215 (2006.01)
 A61P 31/14 (2006.01)
 G01N 33/569 (2006.01)

(56) 对比文件
 WO 2005103259 A1, 2005.11.03
 WO 2004110349 A2, 2004.12.23
 WO 2005081716 A2, 2005.09.09
 WO 2005070959 A2, 2005.08.04
 WO 2005103259 A1, 2005.11.03
 WO 2004096842 A2, 2004.11.11

CN 100408595 C, 2008.08.06
 CN 1566342 A, 2005.01.19
 Ahmed SF, et al..Preliminary
 Identification of Potential Vaccine
 Targets for the COVID-19 Coronavirus
 (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV
 Immunological Studies..《Viruses》.2020,第
 12卷(第3期),
 Gupta V, et al..SARS coronavirus
 nucleocapsid immunodominant T-cell
 epitope cluster is common to both
 exogenous recombinant and endogenous DNA-
 encoded immunogens..《Virology》.2006,第347
 卷(第1期),
 Gupta V, et al..SARS coronavirus
 nucleocapsid immunodominant T-cell
 epitope cluster is common to both
 exogenous recombinant and endogenous DNA-
 encoded immunogens..《Virology》.2006,第347
 卷(第1期),
 Meulen JHT, et al..ADL73856.1.
 《GenBank》.2010,
 Zhang YZ, et al..YP_009724397.1.《NCBI
 Reference Sequence》.2020,
 Akeefe H, et al..AGU31352.1.
 《GenBank》.2013,

审查员 张临政

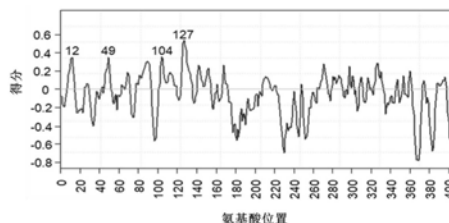
权利要求书1页 说明书7页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称
 新型冠状病毒T细胞表位及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种新型冠状病毒T细胞表位
 及其应用。本发明通过利用IEDB资源预测了
 SARS-CoV-2 N蛋白的T细胞表位,并且免疫小鼠
 进行了验证,发现片段12~20, 49~57, 104~
 112, 127~135具有T细胞表位作用,其中片段127
 ~135效应最强。本发明的研究成果对SARS-CoV-

2疫苗研发和疫情监测具有重要意义。



CN 111440229 B

1. 一种表位肽,所述表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 一种核酸,其编码权利要求1所述的表位肽。
3. 一种重组载体,其包含权利要求2所述的核酸。
4. 一种宿主细胞,其包含权利要求2所述的核酸或导入了权利要求3所述的重组载体。
5. 一种疫苗,其包含以下任一项:
 - (1) 包含权利要求1所述的表位肽作为有效成分;
 - (2) 包含权利要求2所述的核酸作为有效成分;
 - (3) 包含权利要求3所述的重组载体作为有效成分;
 - (4) 包含将权利要求1所述的表位肽呈递至HLA的抗原呈递细胞作为有效成分。
6. 一种针对新型冠状病毒的被动免疫疗法剂,其包含新型冠状病毒特异性T细胞,所述T细胞是利用权利要求1所述的表位肽或将所述表位肽呈递至HLA的抗原呈递细胞刺激外周血淋巴细胞而得到。
7. 一种非诊疗目的的方法,所述方法包括以下任一项:
 - (1) 一种新型冠状病毒特异性T细胞的定量方法,其包含:
用权利要求1所述的表位肽刺激来自对象的外周血;
获得通过前面步骤产生的新型冠状病毒特异性T细胞;
测定获得T细胞所产生的细胞因子和/或趋化因子和/或细胞表面分子;
 - (2) 一种新型冠状病毒特异性T细胞的诱导方法,其包含使用权利要求1所述的表位肽;
 - (3) 一种生产新型冠状病毒特异性T细胞的方法,其包含使用权利要求1所述的表位肽。
8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,(2)中所述方法包括使用权利要求1所述的表位肽和抗原呈递细胞接触。
9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,(3)中所述方法包括使用权利要求1所述的表位肽和外周血单核细胞接触。
10. 一种用于诱导T细胞的试剂盒,其包含权利要求1所述的表位肽作为构成要素。
11. 一种应用,所述应用包括以下任一项:
 - (1) 权利要求1所述的表位肽在制备新型冠状病毒疫苗中的应用;
 - (2) 权利要求1所述的表位肽在制备新型冠状病毒特异性T细胞中的应用;
 - (3) 权利要求1所述的表位肽在制备监测新型冠状病毒的产品中的应用;
 - (4) 权利要求1所述的表位肽在制备诱导T细胞的试剂盒中的应用;
 - (5) 权利要求1所述的表位肽在制备针对新型冠状病毒的抗体中的应用;
 - (6) 权利要求1所述的表位肽在制备检测新型冠状病毒感染的试剂盒中的应用;
 - (7) 权利要求2所述的核酸在制备新型冠状病毒疫苗中的应用;
 - (8) 权利要求3所述的重组载体在制备新型冠状病毒疫苗中的应用;
 - (9) 新型冠状病毒特异性T细胞在制备针对新型冠状病毒的被动免疫疗法剂中的应用,所述T细胞是利用权利要求1所述的表位肽或将所述表位肽呈递至HLA的抗原呈递细胞刺激外周血淋巴细胞而得到。

新型冠状病毒T细胞表位及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,涉及新型冠状病毒T细胞表位及其应用。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒肺炎在全球范围具有很高的传播风险,对人类健康安全造成巨大威胁。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是已知可感染人类的第7种冠状病毒,属于冠状病毒β属,基因组为线性的单股正链RNA,人群具有普遍易感性。新冠肺炎与同属冠状病毒感染的SARS、MERS在病理特征上具有一定相似性,2019-nCoV与SARS-CoV和MERS-CoV分别有约70%和40%的基因序列相似性。早期病例表明,2019-nCoV感染可能不如SARS-CoV和MERS-CoV感染导致的症状严重。但是,发病数迅速增加以及越来越多的人际传播证据表明,该病毒比SARS-CoV和MERS-CoV更具传染性。

[0003] 人体免疫系统是由多个器官、多种免疫细胞以及各种免疫分子构成的一个复杂系统。它们通力合作,构建起防御各种病原体(病毒、细菌、寄生虫等)的层层防线。固有免疫是非特异性免疫系统,要想更加高效地对付某种特定病原体则需要通过适应性免疫系统产生特异性免疫应答来发挥作用。抗体或者疫苗,都与其有着密切的联系。B细胞和T细胞是适应性免疫中的主要“兵种”。与固有免疫中不同的是,这些兵种的战士可以识别并消灭某一种特定的病原体。同时,有些士兵还能记住目标敌人的样子,一旦相同的敌人再次入侵,它们就可以快速拉响警报,发起对入侵者的剿灭战。

[0004] 成熟的B细胞会携带一种被称作B细胞受体的探测器,一旦侦测到相应的抗原,并在辅助T细胞的帮助下,它们就会进行增殖分化。一部分分化成能够产生抗体的浆细胞,另一部分变成记忆B细胞。抗体具有和产生它的B细胞一样的探测器,在体液中巡逻,并标记那些特定的病原体或直接阻碍它们感染人体细胞。疫苗正是利用了这一机制,通过来自病原体的抗原信息激发B细胞产生抗体防御外敌。

[0005] T细胞是另一类重要的特异性免疫细胞。辅助T细胞的主要功能是在识别抗原之后,通过释放细胞因子来调控或辅助其他免疫细胞发挥作用,比如协助激活B细胞、活化杀手T细胞等。杀手T细胞则会瞄准那些带有特定抗原信息的受感染细胞,通过释放细胞毒素来杀死他们。T细胞和B细胞一样,也是利用一种被称作T细胞受体的探测器来识别特定抗原。

[0006] 当B细胞受体或T细胞受体能够和抗原上的某些部分结合时,就完成了对这个抗原的识别。这些能够被结合的部分被称为抗原决定簇或抗原表位。抗原表位鉴定对于SARS-CoV-2疫苗研发和疫情监测具有重要意义。

发明内容

[0007] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种表位肽,所述表位肽的氨基酸序列选自以下组:

[0008] (1) 所述表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1-4所示;

[0009] (2)所述表位肽的氨基酸序列是由SEQ ID NO.1-4所示的序列经取代、缺失、插入和/或添加有1个或多个氨基酸序列形成的氨基酸序列。

[0010] 在本发明的具体实施方案中,所述表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1-4所示。优选地,所述表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0011] 本发明的表位肽可利用以往的各种肽合成方法制备。例如可以使用固相肽合成法等有机化学的合成法、或制备编码肽的核酸、使用重组DNA技术进行制备。另外,也可利用市售的化学合成装置(例如Applied Biosystems公司的肽合成装置)合成。

[0012] 根据本发明的另一个方面,本发明提供了一种核酸,其编码前面所述的表位肽。

[0013] 编码表位肽的核酸对于使用基因重组技术使宿主内产生表位肽是重要。因为氨基酸密码子在宿主间的密码子使用频率不同,因此优选变更氨基酸的密码子以使其适合产生宿主的密码子使用频率。编码表位肽的核酸就疫苗而言亦为重要,可以以裸露的核酸的形式移送,也可使用适当的病毒或细菌载体移送。适当的细菌载体为沙门氏菌属亚种的细菌。适当的病毒载体例如:反转录病毒载体、EBV载体、痘病毒载体、仙台病毒载体、慢病毒载体。

[0014] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种重组载体,其包含前面所述的核酸。

[0015] 所述载体可特别选自pcDNA;pTT(Durocher等,Nucleic Acids Research 2002, Vol 30,No.2);pTT3(具有额外的多克隆位点的pTT);pEFBOS(Mizushima,S.和Nagata,S.,(1990)Nucleic Acids Research Vol 18,No.17);pBV;pJV和pBJ。

[0016] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种宿主细胞,其包含前面所述的核酸或导入了前面所述的重组载体。

[0017] 用本文所披露的载体转化宿主细胞。优选地,宿主细胞为原核细胞。更优选地,宿主细胞为大肠杆菌(E.coli)。在一个相关实施方案中,宿主细胞为真核细胞。优选地,真核细胞选自原生生物细胞、动物细胞(如哺乳动物细胞、禽类细胞和昆虫细胞)、植物细胞和真菌细胞。更优选地,宿主细胞为哺乳动物细胞,包括但不限于CHO和COS;或为真菌细胞,如酵母细胞,例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae);或为昆虫细胞如Sf9。

[0018] 可以通过本领域常规的方法将所述重组载体转化、转导或者转染到宿主细胞中,如氯化钙法化学转化、高压电击转化,优选电击转化。

[0019] 可以使用本领域常用的方法从重组宿主细胞中分离和纯化本发明的表位肽。例如,离心分离培养基和重组宿主细胞,高压匀浆破碎细胞、离心过滤去除细胞碎片,亲和层析纯化表位肽。对于分离纯化所得的产物,可以使用本领域常用的方法进行纯度鉴定。例如,考马斯亮蓝法、凯氏定氮法、双缩脲法、Lowry法、紫外吸收法、亲和层析、抗原抗体法、电泳分析(例如十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)、沉降分析、扩散分析、恒溶度法、蛋白质谱等。

[0020] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种疫苗,其包含前面所述的表位肽作为有效成分。

[0021] 本发明的表位肽在主动免疫疗法中可以作为肽疫苗使用。也就是说,将含有本发明的表位肽制备而成的疫苗对患者授予,使T细胞在体内增殖,对于感染的预防和治疗发挥效用。所使用的表位肽可只有1种,或可根据疫苗的使用目的而将2种以上的肽组合、混用。

[0022] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种疫苗,其包含前面所述的核酸作为有效成分。

[0023] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种疫苗,其包含前面所述的重组载体作为有效成分。

[0024] 编码本发明的表位肽的核酸在主动免疫疗法可用于DNA疫苗、重组病毒载体疫苗等。编码表位肽的核酸序列优选变更为适合重组疫苗、产生重组病毒疫苗的宿主的密码子使用频率。

[0025] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种疫苗,其包含将前面所述的表位肽呈递至HLA的抗原呈递细胞作为有效成分。

[0026] 呈递本发明的T细胞表位肽的抗原呈递细胞可在主动免疫疗法中作为疫苗使用。呈递T细胞表位肽的抗原呈递细胞是指:

[0027] (1) 使抗原呈递细胞与表位肽在适当的培养液中混合30分钟至1小时而得到的表位肽脉冲抗原呈递细胞;

[0028] (2) 使用编码表位肽的核酸,通过基因导入等使抗原呈递细胞呈递表位肽的细胞

[0029] (3) 具有人工制备的抗原呈递能力的人工抗原呈递细胞。

[0030] 抗原呈递细胞是指,例如树突状细胞、B细胞、巨噬细胞、某种T细胞等,是在其细胞表面上表达该肽能结合的HLA分子的细胞,且有CTL刺激能力。

[0031] 本发明的表位肽、或含有呈递有表位肽的抗原呈递细胞而成的疫苗可使用本领域公知的方法制备。例如,作为该疫苗,有含有本发明的表位肽作为有效成分的注射剂或固体剂等。表位肽可以中性或盐的形态配方,例如作为药学上可容许的盐,可列举盐酸、磷酸等无机盐、或乙酸、酒石酸等有机酸。另外,呈递有本发明的表位肽的抗原呈递细胞可以使用制药上可容许,且和该肽或该细胞的活性有相容性的赋形剂,例如水、食盐水、葡萄糖、乙醇、甘油、DMSO (dimethyl sulphoxide, 二甲基亚砷)、及其它佐剂等、或和它们的组合混合使用。此外,视需要也可以添加白蛋白、湿润剂、乳化剂等辅助剂。

[0032] 本发明的疫苗可通过非经口投予及经口投予进行投予,一般而言以非经口投予较佳。作为非经口投予,有经鼻投予、皮下注射、肌肉内注射、静脉内注射等注射剂、栓剂等。另外,作为经口投予,可以制备成和淀粉、甘露醇、乳糖、硬脂酸镁、纤维素等赋形剂的混合物。

[0033] 本发明的疫苗是以治疗上有效的量进行投予。投予量取决于治疗对象、免疫系统,必要的投予量依临床医师的判断决定。另外,投予间隔可依对象、目的来设定。

[0034] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种抗体,所述抗体根据前面所述的表位肽制备而成。

[0035] 术语“抗体”意指由4条多肽链(两条重(H)链和两条轻(L)链)组成的免疫球蛋白分子。链通常通过二硫键彼此连接。每条重链由所述重链的可变区(在此简称为HCVR或VH)和所述重链的恒定区组成。重链恒定区由三个区CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由所述轻链的可变区(在此简称为LCVR或VL)和所述轻链的恒定区组成。轻链恒定区由CL区组成。VH和VL区可进一步分成称为互补决定区(CDRs)的高变区和称为构架区(FR)的交替分布的保守区。因此,每一VH和VL区由以如下顺序从N末端到C末端的排列的三个CDR和四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。该结构对于本领域技术人员是众所周知的。

[0036] 本发明的抗体可以使用本领域的常规技术制备而成,现有技术中常用的制备抗体的方法包括:(1)基于小鼠/兔子的杂交瘤技术;(2)基于噬菌体抗体展示库的抗体筛选技术;(3)基于单克隆抗体库的筛选技术。

[0037] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种针对新型冠状病毒的被动免疫疗法剂,其包含新型冠状病毒特异性T细胞,所述T细胞是利用前面所述的表位肽或将所述表位肽呈递至HLA的抗原呈递细胞刺激外周血淋巴细胞而得到。

[0038] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种新型冠状病毒特异性T细胞的定量方法,其包含:

[0039] 用前面所述的表位肽刺激来自对象的外周血;

[0040] 获得通过前面步骤产生的新型冠状病毒特异性T细胞;

[0041] 测定获得的T细胞所产生的细胞因子和/或趋化因子和/或细胞表面分子。

[0042] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种新型冠状病毒特异性T细胞的诱导方法,其包含使用前面所述的表位肽;优选地,所述方法包括使用前面所述的表位肽和抗原呈递细胞接触。

[0043] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种生产新型冠状病毒特异性T细胞的方法,其包含使用前面所述的表位肽,优选地,所述方法包括使用前面所述的表位肽和外周血单核细胞接触。

[0044] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种用于诱导T细胞的试剂盒,其包括前面所述的表位肽作为构成要素。

[0045] 所述试剂盒包括前面所述的表位肽,或包括新型冠状病毒的检测试剂,或包括新型冠状病毒的检测试纸。

[0046] 所述新型冠状病毒的检测试剂包括前面所述的表位肽。例如,所述试剂是磁珠试剂,所述表位肽包被在所述磁珠上。

[0047] 所述新型冠状病毒的检测试纸包括衬底以及设在衬底上的前面所述的表位肽。

[0048] 进一步,所述试剂盒还可以包括样本稀释液、包被液、封闭液、洗涤液、显色液中的至少一种。

[0049] 更进一步,所述样本稀释液包括碳酸盐缓冲液、PBS缓冲液、TBS缓冲液。

[0050] 具体地,包被液可以包括碳酸盐缓冲液、PBS缓冲液、TBS缓冲液。当然可以理解的是,在其他一些实施方式中,包被液还可以是本领域常见的其他包被液。

[0051] 具体地,封闭液可以包括含1%~3% (v/v) BSA的PBS溶液、含1%~3% (v/v) BSA的Casein溶液、10% (v/v) 马血清溶液。当然可以理解的是,在其他一些实施方式中,封闭液还可以是本领域常见的其他封闭液。

[0052] 具体地,洗涤液包括含0.05%~0.2% (v/v) Tween-20的PBST、含0.05%~0.2% (v/v) Tween-20的TBS、10% Triton。当然可以理解的是,在其他一些实施方式中,洗涤液还可以是本领域常见的其他洗涤液。

[0053] 本发明的试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0054] 待测样本与包被在固相载体上的本发明的表位肽混合后温育,然后加入检测抗体,继续温育,检测,得到检测结果。

[0055] 具体地,所述检测抗体能够与新型冠状病毒抗体结合且带有检测标记。检测标记可以是酶标记、荧光素标记、生物素标记和胶体金标记中的任意一种。

[0056] 具体地,显色液根据检测抗体的标记类型进行选择。

[0057] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了前面所述的表位肽在制备新型冠状病毒

疫苗中的应用。

[0058] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了前面所述的表位肽在制备新型冠状病毒特异性T细胞中的应用。

[0059] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了前面所述的表位肽在制备监测新型冠状病毒进化的产品中的应用。

[0060] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了前面所述的表位肽在制备诱导T细胞的试剂盒中的应用。

[0061] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了前面所述的表位肽在制备针对新型冠状病毒抗体中的应用。

[0062] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了前面所述的表位肽在制备检测新型冠状病毒感染的试剂盒中的应用。

[0063] 所述试剂盒的限定同前面所述。

[0064] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了前面所述的核酸在制备新型冠状病毒疫苗中的应用。

[0065] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了前面所述的重组载体在制备新型冠状病毒疫苗中的应用。

[0066] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了新型冠状病毒特异性T细胞在制备针对新型冠状病毒的被动免疫疗法剂中的应用,所述T细胞是利用前面所述的表位肽或将所述表位肽呈递至HLA的抗原呈递细胞刺激外周血淋巴细胞而得到。

附图说明

[0067] 图1显示T细胞表位肽得分图;

[0068] 图2显示利用流式细胞仪检测CD44和CD62L表达的流式结果图;

[0069] 图3显示淋巴结中的总细胞数量和T细胞数量的变化统计图;

[0070] 图4显示脾中的总细胞数量和T细胞数量的变化统计图。

具体实施方式

[0071] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0072] 实施例1表位预测

[0073] 利用IEDB资源Class I Immunogenicity工具预测了SARS-CoV-2N蛋白(NCBI accession number: YP_009724397.2)的T细胞表位,该工具分析了600个具有免疫原性、181个不具有免疫原性的9mer肽,总结出两个特征。第一个特征,富含苯丙氨酸、异亮氨酸、色氨酸的肽段免疫原性强,而富含丝氨酸、赖氨酸、蛋氨酸的肽段免疫原性弱。第二个特征,9mer肽中第4-6个氨基酸在肽段的免疫原性中起重要作用。将蛋白序列分解成系列9mer肽,彼此相邻的9mer肽具有8mer重叠。并且将9mer肽的第一个、第二个氨基酸和C末端氨基酸遮盖。然后计算每个9mer肽的得分,选出分值最高的4个9mer肽。见图1和表1。发现片段12~20, 49

~57,104~112,127~135得分较高,其中片段127~135得分最高。

[0074] 表1 9mer肽的基本信息

表位肽	起始	终止	得分	相似度 (%)	
				SARS	MERS
KDGIHWVAT (SEQ ID NO.1)	127	135	0.54073	78	67
LSPRWYFYFYY (SEQ ID NO.2)	104	112	0.35734	100	78
APRITFGGP (SEQ ID NO.3)	12	20	0.34712	100	56
TASWFTALT (SEQ ID NO.4)	49	57	0.34627	100	67

[0076] 实施例2表位肽功能验证

[0077] 1、小鼠免疫

[0078] 8周大Ba1b/c雌性小鼠购于维通利华公司。9mer肽(SEQ ID NO.1-4)由北京赛百盛公司合成,纯度90%以上。氟氏完全佐剂购于Sigma公司。百日咳毒素购于Merck公司。用PBS将肽溶解为2mg/ml,肽与氟氏完全佐剂(1:1)完全混合成油包水,每只小鼠皮下免疫100微克肽,对照组不予抗原处理。在免疫后第0h、24h给予全部小鼠腹腔注射百日咳毒素,每只小鼠500ng/0.2ml。

[0079] 2、流式细胞术

[0080] FACS洗液配制:1L PBS溶液中加入20mL胎牛血清和1mL 10%NaN₃,混匀,储存于4℃备用。

[0081] 取出小鼠脾或淋巴结细胞后计数,每个样品取 1×10^6 个细胞,加入1mL FACS洗液,6000rpm离心30s,弃上清,加入100μL FACS洗液重悬。设置裸细胞和不同荧光通道抗体的单标。按照1:100加入荧光抗体,裸细胞不加抗体,单标只加对应通道的抗体。4℃避光染色30min。1mL FACS洗液重悬细胞,6000rpm离心30s,弃上清,每管加入200μL 1%多聚甲醛溶液固定细胞,一周内上机检测。所有流式抗体购于Biolegend公司。

[0082] 3、结果

[0083] 本研究将表位肽合成以后皮下免疫8周大雌性Ba1b/c小鼠,7天后取出引流淋巴结(LN)和脾(SP),发现二者都肿大,细胞计数显示细胞总量增加。流式染色CD4、CD8、CD44、CD62L,结果发现CD4⁺和CD8⁺T细胞数量均增加。另外还分析了CD44、CD62L表达情况,结果发

现片段127~135效果最强,使CD44^{low}CD62L^{hi} naïve群体比例下降。其它肽在这么短的时间内影响CD44、CD62L表达能力不强,但是因为CD4+和CD8+T细胞数量增加,所以活化的CD4+和CD8+T细胞数量都增加。结果参见图2-4。

[0084] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院
- [0003] <120> 新型冠状病毒T细胞表位及其应用
- [0004] <160> 4
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 9
- [0008] <212> PRT
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] Lys Asp Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr
- [0012] 1 5
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 9
- [0015] <212> PRT
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr
- [0019] 1 5
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 9
- [0022] <212> PRT
- [0023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0024] <400> 3
- [0025] Ala Pro Arg Ile Thr Phe Gly Gly Pro
- [0026] 1 5
- [0027] <210> 4
- [0028] <211> 9
- [0029] <212> PRT
- [0030] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0031] <400> 4
- [0032] Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr
- [0033] 1 5



图1

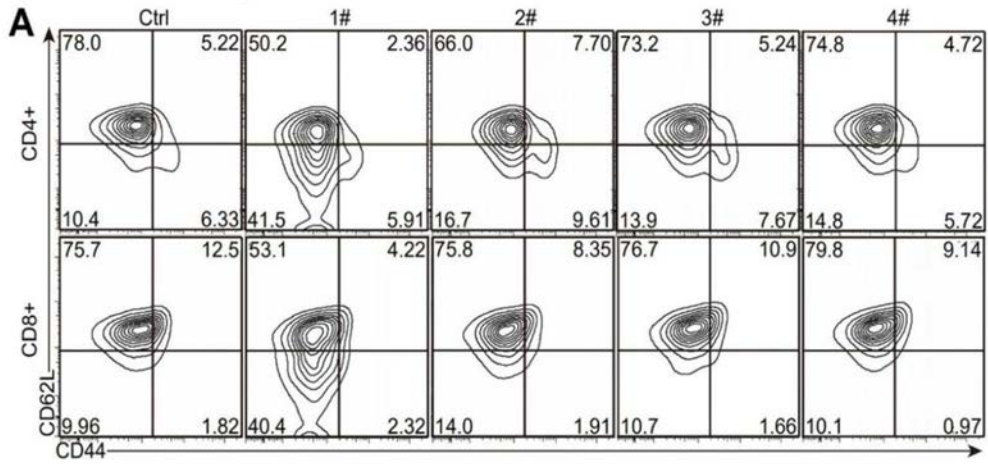


图2

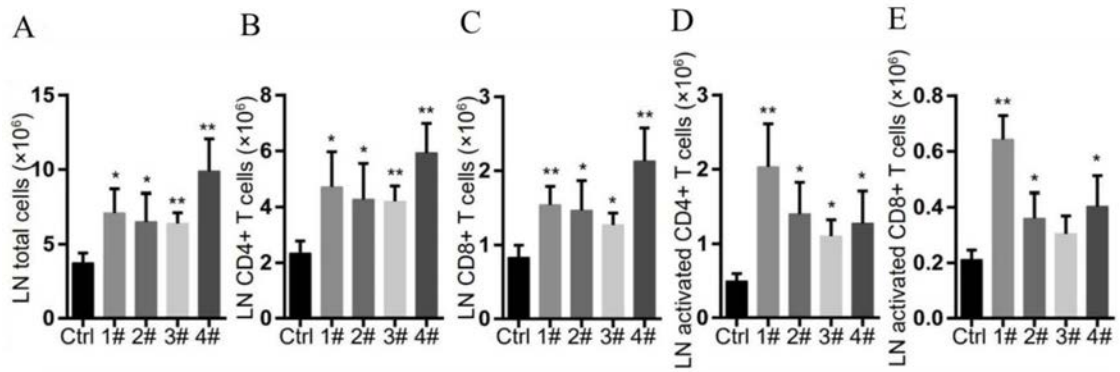


图3

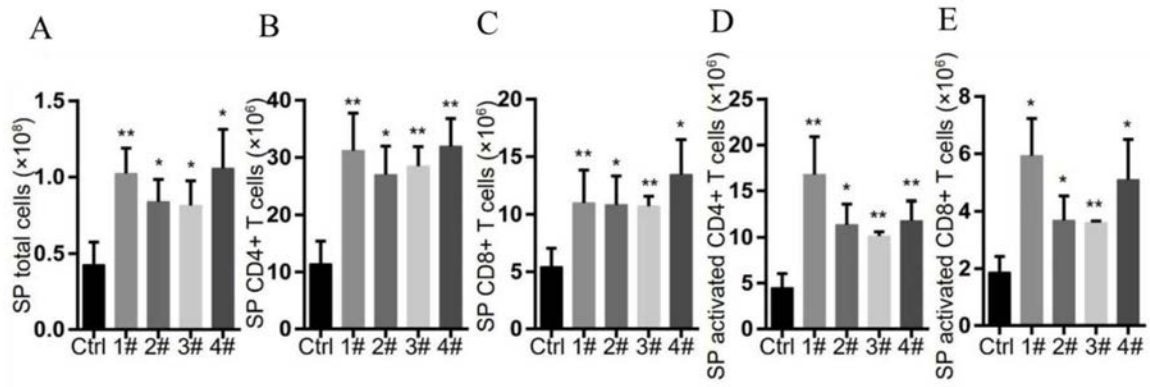


图4