



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117886891 B

(45) 授权公告日 2024. 06. 07

(21) 申请号 202410294507.6

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2024.03.15

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 104168903 A, 2014.11.26

申请公布号 CN 117886891 A

CN 114437237 A, 2022.05.06

CN 1738645 A, 2006.02.22

(43) 申请公布日 2024.04.16

US 2017095531 A1, 2017.04.06

(73) 专利权人 黑龙江八一农垦大学

龙晨. “草鱼呼肠孤病毒Ⅲ型VP39蛋白多克隆抗体制备及其功能初探”.《中国学位论文全文数据库》.2024,摘要、表4-2.

地址 163000 黑龙江省大庆市高新区新凤路5号

(72) 发明人 佟春玉 宋博翠 张喆林

龙晨等. “用噬菌体展示技术筛选草鱼呼肠孤病毒VP39蛋白相互作用多肽”.《水生生物学报》.2023,第47卷(第6期),第2.5节.

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

Daniel Perez-Zsolt 等. “Dendritic Cells From the Cervical Mucosa Capture and Transfer HIV-1 via Siglec-1”.《Frontiers in Immunology》.2019,第10卷第1-14页.

专利代理师 李洋

审查员 唐雪珂

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页
序列表(电子公布) 附图10页

(54) 发明名称

靶向巨噬细胞CD169受体的多肽及其应用

(57) 摘要

本发明公开了靶向巨噬细胞CD169受体的多肽及其应用。所述多肽的氨基酸序列如序列2所示。本发明还公开了基于所述多肽制备的重组蛋白抗原。通过实验证明：本发明提供的多肽与抗原蛋白进行融合表达得到的融合蛋白与巨噬细胞进行孵育后显示该多肽可将抗原蛋白递送至巨噬细胞。本发明提供的重组蛋白抗原可诱导机体产生更高水平的体液免疫应答和细胞免疫应答。本发明多肽的靶向性作用将在抗原递送中发挥巨大作用，可显著提高抗原利用率，增强机体细胞免疫及体液免疫应答水平，加强靶向药物或免疫制剂的使用效果。



1. 一种重组蛋白,所述重组蛋白为如下a)或b):
 - a) 氨基酸序列是序列4所示的蛋白质;
 - b) 在序列4所示的蛋白质的N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质。
2. 与权利要求1所述重组蛋白相关的生物材料,所述生物材料为编码权利要求1所述重组蛋白的核酸分子或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体或重组微生物。
3. 一种疫苗,其活性成分为权利要求1所述的重组蛋白或权利要求2所述的生物材料。
4. 根据权利要求3所述的疫苗,其特征在于:所述疫苗为抗金黄色葡萄球菌感染的疫苗。
5. 多肽或编码所述多肽的核酸分子在制备靶向巨噬细胞CD169受体的产品中的应用;所述多肽为如下1)或2)中任一种:
 - 1) 氨基酸序列是序列2的多肽;
 - 2) 在1)所述多肽的N端或C端添加荧光标签后得到的多肽。
6. 权利要求1所述的重组蛋白或权利要求2所述的生物材料在制备疫苗中的应用;所述疫苗为抗金黄色葡萄球菌感染的疫苗。

靶向巨噬细胞CD169受体的多肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及靶向巨噬细胞CD169受体的多肽及其应用。

背景技术

[0002] 目前,我国兽用药物研发水平较发达国家弱,主要以化学药物为主,其中针对兽病的靶向药物更是匮乏,国内市场缺口大,亟待研发。CD169受体又称唾液酸黏附素,是特异性表达在组织巨噬细胞表面的一种介导吞噬作用的蛋白质受体。该受体可有效增强巨噬细胞对外来病原体的捕获和吞噬,提高机体固有免疫应答水平;同时CD169⁺巨噬细胞还可以将捕获的抗原递呈至树突状细胞从而引起强烈的适应性免疫应答反应,因此可以通过靶向巨噬细胞CD169受体以增强药物和免疫制剂的生物学作用。

[0003] 噬菌体展示技术可快速高效地筛选得到与靶标分子特异性结合的多肽片段,是新药研发中重要的技术之一。以固相筛选方法将CD169蛋白包被至固相基质上并使用商品化的噬菌体展示随机12肽库进行多轮生物淘选,得到特异性结合的多肽片段。这样筛选出的多肽片段不仅自身具有良好的靶向性和特异性,还有利于结合药物提供靶向性,但不影响药物的生物学活性,提升药物效果。

[0004] TRAP(Target of RNAlIIII Activating Protein)蛋白是特异性表达在金黄色葡萄球菌中的一种蛋白质,众多的研究证明TRAP蛋白具有良好的免疫原性,在小鼠和牛的免疫中产生了良好的免疫保护作用,可作为一种通用的抗葡萄球菌感染的疫苗表位(Leitner G, Krifucks O, Kiran M D, et al. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows[J]. Veterinary Immunology& Immunopathology, 2011, 142(1-2):25-35.)。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种靶向巨噬细胞CD169受体的多肽及其应用。

[0006] 第一方面,本发明请求保护一种多肽。

[0007] 本发明请求保护的多肽为如下1)或2)中任一种:

[0008] 1)氨基酸序列是序列2的多肽;

[0009] 2)在1)所述多肽的N端或C端添加荧光标签后得到的多肽。

[0010] 在本发明的一个具体实施方案中,所述荧光标签为罗丹明B。

[0011] 第二方面,本发明请求保护编码上述多肽的核酸分子。

[0012] 本发明请求保护的编码上述多肽的核酸分子为如下A1)或A2)中任一种:

[0013] A1)序列3第7-42位所示的DNA分子;

[0014] A2)与A1)限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性,且编码上述多肽的DNA分子。

[0015] 上述A2)所述DNA分子中,所述同一性是指与天然核酸序列的序列相似性。所述同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件,两个或多个序列之间的同一性

可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。所述同一性包括与本发明的编码序列2所示的氨基酸序列组成的蛋白质的核苷酸序列具有75%或更高,或80%或更高,或85%或更高,或90%或更高,或95%或更高同一性的核苷酸序列。

[0016] 本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法,例如定向进化和点突变的方法,对本发明的编码上述多肽的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的,具有与本发明分离得到的A1)所述核苷酸序列75%或者更高同一性的核苷酸,只要编码上述多肽且具有相同功能,均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。

[0017] 第三方面,本发明请求保护一种重组蛋白。

[0018] 本发明请求保护的重组蛋白包括抗原蛋白和上述多肽。

[0019] 进一步的,所述抗原蛋白为金黄色葡萄球菌TRAP蛋白。

[0020] 再进一步的,所述重组蛋白依次包括上述多肽、柔性片段(G₄S)₃和金黄色葡萄球菌TRAP蛋白。

[0021] 更进一步的,所述重组蛋白为如下a)-d)中任一种:

[0022] a) 氨基酸序列是序列4所示的蛋白质;

[0023] b) 在序列4所示的蛋白质的N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质;

[0024] c) 将序列4所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的蛋白质;

[0025] d) 与序列4所示的氨基酸序列具有75%或75%以上的同一性且具有相同功能的蛋白质。

[0026] 上述b)所述蛋白质中,所述标签(protein-tag)是指利用DNA体外重组技术,与目的蛋白一起融合表达的一种多肽或者蛋白,以便于目的蛋白的表达、检测、示踪或纯化。具体可为GFP标签、Flag标签、His标签、MBP标签、HA标签、myc标签、GST标签和/或SUMO标签等。

[0027] 在本发明的一个实施方案中,所述重组蛋白的N端携带6×His标签且C端携带GFP标签和6×His标签。

[0028] 上述c)所述蛋白质中,所述一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加具体可为不超过10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加,或不超过9个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加,或不超过8个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加,或不超过7个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加,或不超过6个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加,或不超过5个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加,或不超过4个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加,或不超过3个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加,或不超过2个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加,或不超过1个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加。

[0029] 上述d)所述蛋白质中,所述同一性是指氨基酸序列的同一性。所述同一性可使用国际互联网上的同源性检索站点测定氨基酸序列的同一性,如NCBI主页网站的BLAST网页。例如,可在高级BLAST2.1中,通过使用blastp作为程序,将Expect值设置为10,将所有Filter设置为OFF,使用BLOSUM62作为Matrix,将Gap existence cost,Per residue gap cost和Lambda ratio分别设置为11,1和0.85(缺省值)并进行检索一对氨基酸序列的同一性进行计算,然后即可获得同一性的值(%)。所述同一性包括与本发明的序列4所示的氨基酸序列具有75%或更高,或具有80%或更高,或具有85%或更高,或具有90%或更高,或91%或更

高,或92%或更高,或93%或更高,或94%或更高,或95%或更高,或96%或更高,或97%或更高,或98%或更高,或99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0030] 上述a) -d)任一所述蛋白质可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0031] 第四方面,本发明请求保护与上述重组蛋白相关的生物材料。

[0032] 本发明请求保护的与上述重组蛋白相关的生物材料为编码上述重组蛋白的核酸分子或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体或重组微生物。

[0033] 所述核酸分子可为如下B1)或B2)中任一种:

[0034] B1) 序列3所示的DNA分子;

[0035] B2) 与B1)限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性,且编码上述重组蛋白的DNA分子。

[0036] 上述B2)所述DNA分子中,所述同一性是指与天然核酸序列的序列相似性。所述同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件,两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。所述同一性包括与本发明的编码序列4所示的氨基酸序列组成的蛋白质的核苷酸序列具有75%或更高,或80%或更高,或85%或更高,或90%或更高,或95%或更高同一性的核苷酸序列。

[0037] 本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法,例如定向进化和点突变的方法,对本发明的编码上述重组蛋白的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的,具有与本发明分离得到的B1)所述核苷酸序列75%或者更高同一性的核苷酸,只要编码上述重组蛋白且具有相同功能,均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。

[0038] 所述表达盒可为能够在宿主细胞中表达上述重组蛋白的DNA,该DNA不但可包括启动上述重组蛋白编码基因转录的启动子,还可包括终止上述重组蛋白编码基因转录的终止子。所述表达盒还可包括增强子序列。

[0039] 所述载体是指能够把编码上述重组蛋白的核酸分子运载进入宿主细胞进行扩增和表达的载体,所述载体可以是克隆载体也可以是表达载体,包括但不限于:质粒、噬菌体(如 λ 噬菌体或M13丝状噬菌体等)、黏粒(即柯斯质粒)、Ti质粒、病毒载体(如逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒等)。所述重组载体是指将编码上述重组蛋白的核酸分子与载体在体外连接构建而成的重组DNA分子。

[0040] 所述微生物可为细菌、真菌、放线菌、原生动物、藻类或病毒。其中,所述细菌可为大肠杆菌(*Escherichia coli*)。所述重组微生物是指对目的微生物的基因进行操作和修饰,从而得到功能发生变化的重组微生物。如将编码上述重组蛋白的核酸分子或含有所述核酸分子的表达盒或重组载体导入目的微生物后得到的重组微生物。

[0041] 第五方面,本发明请求保护一种疫苗。

[0042] 本发明请求保护的疫苗的活性成分为上述重组蛋白。

[0043] 在本发明的一个实施方案中,所述疫苗还包括铝盐佐剂。

[0044] 在本发明的一个优选实施方案中,所述铝盐佐剂为氢氧化铝佐剂。

[0045] 在本发明的一个实施方案中,所述疫苗为将上述重组蛋白溶液与氢氧化铝佐剂混匀得到的。

[0046] 在本发明的一个优选实施方案中,所述重组蛋白溶液的浓度为2.00 mg/mL。所述

重组蛋白溶液与所述氢氧化铝佐剂的体积比为1:1。

[0047] 第六方面,本发明请求保护如下a1) -a10)中任一种应用:

[0048] a1) 上述多肽或与上述多肽相关的生物材料在靶向巨噬细胞CD169受体中的应用;

[0049] a2) 上述多肽或与上述多肽相关的生物材料在制备靶向巨噬细胞CD169受体的产品中的应用;

[0050] a3) 上述多肽或与上述多肽相关的生物材料在将抗原或药物或免疫制剂递送至巨噬细胞中的应用;

[0051] a4) 上述多肽或与上述多肽相关的生物材料在制备将抗原或药物或免疫制剂递送至巨噬细胞的产品中的应用;

[0052] a5) 上述多肽或与上述多肽相关的生物材料在增强抗原或药物或免疫制剂的生物学作用中的应用;

[0053] a6) 上述多肽或与上述多肽相关的生物材料在制备增强抗原或药物或免疫制剂的生物学作用的产品中的应用;

[0054] a7) 上述重组蛋白或与所述重组蛋白相关的生物材料在提高机体免疫应答水平中的应用;

[0055] a8) 上述重组蛋白或与所述重组蛋白相关的生物材料在制备提高机体免疫应答水平的产品中的应用;

[0056] a9) 上述重组蛋白在作为抗原或免疫原中的应用;

[0057] a10) 上述多肽或与上述多肽相关的生物材料或上述重组蛋白或与上述重组蛋白相关的生物材料在制备疫苗中的应用。

[0058] 上述应用中,所述将抗原递送至巨噬细胞的方法可包括如下步骤:将上述多肽与抗原或药物或免疫制剂进行融合表达或偶联,得到重组蛋白或偶联物;然后将所述重组蛋白或偶联物置于含有巨噬细胞的环境中,进而使抗原或药物或免疫制剂进入所述巨噬细胞。

[0059] 进一步的,将上述多肽与抗原进行融合表达的方法可为将上述重组蛋白的编码基因导入宿主菌中。

[0060] 再进一步的,所述含有巨噬细胞的环境可为含有巨噬细胞的人或动物机体,也可为巨噬细胞培养体系。

[0061] 更进一步的,所述抗原具体为抗原蛋白。

[0062] 在本发明的一个具体实施方案中,所述抗原蛋白为金黄色葡萄球菌TRAP蛋白。

[0063] 在本发明的一个具体实施方案中,所述重组蛋白的编码基因的核苷酸序列如序列3所示。

[0064] 在本发明的一个具体实施方案中,所述宿主菌为大肠杆菌(如大肠杆菌BL21 (DE3)菌株)。

[0065] 在本发明的一个具体实施方案中,将所述重组蛋白置于含有巨噬细胞的环境中为将所述重组蛋白加入至巨噬细胞培养体系中。所述重组蛋白在所述巨噬细胞培养体系中的浓度为1 mg/mL。所述巨噬细胞为小鼠巨噬细胞RAW264.7(未诱导型)。

[0066] 上述应用中,所述增强抗原或药物或免疫制剂的生物学作用为增强抗原蛋白的生物学作用。

[0067] 进一步的,所述抗原蛋白为金黄色葡萄球菌TRAP蛋白。

[0068] 更进一步的,所述增强金黄色葡萄球菌TRAP蛋白的生物学作用体现为降低感染金黄色葡萄球菌奶牛乳样中的金黄色葡萄球菌检出率和/或降低感染金黄色葡萄球菌奶牛乳样中的体细胞数和/或提高感染金黄色葡萄球菌奶牛的免疫应答水平。

[0069] 在本发明的一个具体实施方案中,所述提高感染金黄色葡萄球菌奶牛的免疫应答水平体现为提高感染金黄色葡萄球菌奶牛产生的IgA抗体水平和/或IgG1抗体水平和/或IgG2抗体水平。

[0070] 上述任一所述免疫应答水平包括细胞免疫水平(如IgG2抗体水平)和/或体液免疫水平(如IgG1抗体水平)。

[0071] 上述任一所述机体包括包括哺乳动物,所述哺乳动物包括灵长类动物(牛、马、山羊、绵羊、猫、兔、猪、骆驼、大鼠、小鼠、豚鼠)、非人灵长类动物(如猿、猴、狒狒、猩猩)和人,优选是人。

[0072] 在本发明的一个具体实施例中,所述机体为牛(如奶牛)。

[0073] 上述任一所述金黄色葡萄球菌TRAP蛋白的氨基酸序列如序列4第30-196位所示。

[0074] 上述任一所述产品可为疫苗,所述疫苗具体为抗金黄色葡萄球菌感染的疫苗。

[0075] 本发明首先利用噬菌体展示技术,通过体外多轮固相筛选,最终筛选得到靶向结合巨噬细胞CD169受体蛋白的多肽CD169-T1,其氨基酸序列如序列2所示;然后通过酶联免疫吸附实验及免疫荧光实验进行靶向验证,结果均显示本发明筛选所得多肽对巨噬细胞CD169受体具有良好的特异性及靶向性作用;最后通过将该多肽CD169-T1与TRAP抗原蛋白进行融合表达得到的重组蛋白CD169-T1-TRAP与巨噬细胞进行孵育后显示该多肽可将TRAP抗原蛋白递送至巨噬细胞。以上实验表明:本发明多肽CD169-T1的靶向性作用可显著提高抗原利用率,增强机体细胞免疫及体液免疫应答水平,加强靶向药物或免疫制剂的使用效果,将在抗原或药物或免疫制剂递送中发挥巨大作用。进一步的,本发明将重组蛋白CD169-T1-TRAP与铝盐佐剂混匀乳化得到的疫苗免疫感染金黄色葡萄球菌奶牛并检测了该疫苗对感染金黄色葡萄球菌奶牛的保护作用。结果表明,金黄色葡萄球菌在CD169-T1-TRAP免疫组与TRAP-Fcr免疫组的检出率显著低于TRAP免疫组,靶向重组蛋白CD169-T1-TRAP免疫组与TRAP-Fcr免疫组所诱导特异性抗体滴度显著高于TRAP免疫组,诱导机体产生特异性IgA、IgG1和IgG2的抗体水平均高于TRAP免疫组,且CD169-T1-TRAP免疫组的IgG2抗体水平显著高于TRAP-Fcr免疫组。以上实验结果表明:相对于TRAP蛋白,重组蛋白CD169-T1-TRAP与TRAP-Fcr诱导机体产生更高的体液免疫应答的同时,也诱导机体产生了更高水平的细胞免疫应答,并且重组蛋白CD169-T1-TRAP诱导细胞免疫水平显著高于重组蛋白TRAP-Fcr。

附图说明

[0076] 图1为pET-28a(+)/CD169重组表达载体的结构示意图。

[0077] 图2为pET-28a(+)/CD169重组表达载体的酶切鉴定结果。

[0078] 图3为蛋白质诱导表达及可溶性鉴定结果。1为pET-28a(+)/CD169表达菌株诱导前;2为pET-28a(+)/CD169表达菌株诱导后;3为pET-28a(+)载体菌株诱导前;4为pET-28a(+)载体菌株诱导后;5为pET-28a(+)/CD169表达菌株超声后上清液;6为pET-28a(+)/CD169表达菌株超声后沉淀。

[0079] 图4为表达蛋白纯化鉴定结果。1为pET-28a (+)/CD169表达菌株诱导前;2为pET-28a (+)/CD169表达菌株诱导后;3为pET-28a (+)载体菌株诱导前;4为pET-28a (+)载体菌株诱导后;5为pET-28a (+)/CD169表达菌株超声后上清液;6为pET-28a (+)/CD169表达菌株超声后沉淀;7为CD169蛋白纯化。

[0080] 图5为CD169蛋白质Western bolt鉴定结果。

[0081] 图6为六轮噬菌体肽库筛选洗脱滴度测定。第一行从左至右分别是1至3轮洗脱噬菌体滴度测定,第二行从右至左分别是4至6轮洗脱噬菌体滴度测定。

[0082] 图7为ELISA筛选所得的21个噬菌体。“*”表示靶标蛋白CD169组与BSA蛋白对照组间显著性差异, $P < 0.05$ 。

[0083] 图8为筛选21个噬菌体DNA测序结果。其中,边框中为编码随机多肽片段的基因序列。

[0084] 图9为带有化学荧光标签(罗丹明B,Rhodamine B)的多肽CD169-T1的结构。

[0085] 图10为多肽CD169-T1与靶标蛋白、BSA蛋白结合力检测及与TRAP蛋白的交叉反应检测。“*”表示显著性差异 $0.01 < P < 0.05$;“**”表示极显著性差异 $P < 0.01$;“NS”表示无显著性差异。

[0086] 图11为多肽CD169-T1与靶标细胞及对照组细胞的免疫荧光检测。使用DAPI蓝色染料染色细胞核,多肽CD169-T1带有Rhodamine B橙红色荧光标记,检测显示在对照组牛肾细胞MDBK中未发现明显Rhodamine B橙红色荧光标记,而在诱导型小鼠巨噬细胞RAW264.7中检出大量Rhodamine B橙红色荧光标记,且经merge后橙红色荧光标记在DAPI染色细胞核周围的细胞膜出现,证明多肽CD169-T1与靶标细胞膜表面的CD169受体结合,多肽CD169-T1具有靶向靶标细胞的能力,同时具有一定的特异性。

[0087] 图12为重组蛋白CD169-T1-TRAP原核表达载体质粒图谱。其中,重组蛋白CD169-T1-TRAP两端添加组氨酸标签便于分离纯化,两侧酶切位点为BamHI和HindIII,质粒携带卡那霉素筛选抗性。

[0088] 图13为质粒转化大肠杆菌BL21 (DE3) 后的阳性克隆的酶切鉴定结果。其中,在1%琼脂糖凝胶电泳的结果中,marker为10000 bp,载体大小为5300 bp,重组蛋白基因大小为594 bp,在单酶切泳道中只有一条明显条带,而在双酶切泳道中出现两条明显条带且大小分别对应载体及重组蛋白基因,证明载体构建成功。

[0089] 图14为Western blot 检测重组蛋白CD169-T1-TRAP。

[0090] 图15为CD169-T1靶向多肽递送金黄色葡萄球菌TRAP抗原蛋白至巨噬细胞。左图为TRAP,右图为CD169-T1-TRAP。

[0091] 图16为分菌率检测结果。

[0092] 图17为牛血清中总IgG抗体水平检测结果。

[0093] 图18为牛乳中IgA抗体水平检测结果。

[0094] 图19为牛血清中IgG1抗体水平检测结果。

[0095] 图20为牛血清中IgG2抗体水平检测结果。

具体实施方式

[0096] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐

明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0097] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0098] 下述实施例中的蛋白TRAP和重组蛋白TRAP-Fc γ R(对应于文献中的T-Fc γ R蛋白)均记载于授权公开号为CN114437237B,发明名称为“金黄色葡萄球菌TRAP靶向重组蛋白抗原及其用途”的发明专利中。

[0099] 实施例1、巨噬细胞CD169受体蛋白体外诱导表达及纯化

[0100] 一、重组表达载体pET-28a(+)/CD169的构建

[0101] 1、靶标蛋白表达载体构建

[0102] 使用SnapGene软件设计以pET-28a(+)载体为核心的大肠杆菌原核表达系统,将CD169受体蛋白的1~4结构域基因序列(GeneBank ID:XP024856847.1)以大肠杆菌BL21(DE3)宿主菌的密码子偏向性进行密码子优化,以增加目的蛋白的产量,优化基因序列如序列1所示。

[0103] 将pET-28a(+)载体(上海生工生物工程股份有限公司)多克隆位点中所含的BamHI和HindIII酶切位点间的DNA片段替换为序列1所示的优化基因序列,得到重组表达载体,并将其命名为pET-28a(+)/CD169。重组表达载体pET-28a(+)/CD169的结构示意图如图1所示。

[0104] 2、重组表达载体pET-28a(+)/CD169的酶切鉴定

[0105] 将含有pET-28a(+)/CD169质粒的甘油菌在含有卡那霉素的LB固体平板上划线活化,37°C过夜培养,挑取单个菌落并接入LB液体培养基培养,菌液浑浊后离心收集菌体;按照细菌质粒提取试剂盒说明提取表达载体质粒,并使用NanoDrop2000仪器检测提取质粒的浓度;将定量至1 μ g的质粒加入1.5 mL的离心管中,加入2 μ L 10 \times CutsmartBuffer并加入NEB公司的BamHI和HindIII限制性内切酶各1 μ L;补加ddH₂O至20 μ L,37°C温浴30 min;酶切产物使用琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图2所示,结果显示:目的基因在双酶切样品泳道1164 bp处有明显的条带,证明重组表达载体pET-28a(+)/CD169构建成功。

[0106] 二、目的蛋白的诱导表达与纯化

[0107] 1、目的蛋白诱导表达及可溶性检测

[0108] 将重组表达载体pET-28a(+)/CD169转入大肠杆菌BL21(DE3)(上海生工生物工程股份有限公司),得到重组菌pET-28a(+)/CD169/BL21(DE3)。培养重组菌pET-28a(+)/CD169/BL21(DE3)至菌液OD₆₀₀值约0.6时取1 mL菌液于1.5 mL离心管留样,加入1 mM IPTG诱导,蛋白诱导6小时后取1 mL菌液留样,离心收集菌体沉淀;菌体沉淀加破菌缓冲液重悬,冰浴超声破碎,再次离心,取1 mL上清液留样,沉淀用含尿素的破菌缓冲液重悬并4°C静置20分钟,离心后取上清液留样,以诱导前后的空载体菌株为对照组,制备蛋白样品进行SDS-PAGE电泳检验。结果如图3所示,结果显示:CD169蛋白在43 KDa处的诱导后、超声破碎沉淀中条带明显大于诱导前及超声破碎上清液,证明目的蛋白诱导成功且目的蛋白为不可溶的包涵体沉淀。

[0109] 2、目的蛋白的分离纯化

[0110] 将超声破碎并离心收集的沉淀物经含尿素的破菌缓冲液重悬后4°C静置20分钟,

离心收集上清液,经0.22 μm 一次性针头滤器过滤后,所得蛋白液体4 $^{\circ}\text{C}$ 暂存备用;亲和层析镍柱加入一柱体积分含尿素的破菌缓冲液平衡,待柱内液体自然流出后加入蛋白液体,4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下随重力自然流穿镍柱,流穿液体收集再次过柱,反复3次,增加标签蛋白挂柱量;使用10柱体积的洗杂蛋白缓冲液清洗已挂柱的蛋白,将非特异性结合及结合较弱的杂蛋白去除,并使用考马斯亮蓝R250染液检验流穿液体中蛋白含量,当流穿液体和洗杂蛋白缓冲液的考马斯亮蓝检测结果无显著差异时,即为清洗干净;待镍柱内液体流净后加入一定体积的目的蛋白洗脱缓冲液收集纯化后的蛋白,收集液体反复3次过柱增加蛋白洗脱量;收集纯化蛋白液体经BCA法测定所含蛋白质浓度,取30 μL 纯化蛋白液体制备蛋白质样品,SDS-PAGE电泳检验纯化效果。结果如图4所示,结果显示:纯化后的蛋白样品除43 kDa处有明显条带外,无杂蛋白条带出现,证明纯化结果良好。

[0111] 3、纯化蛋白的Western Blot验证

[0112] 纯化后蛋白制样进行SDS-PAGE电泳后,使用半干转膜仪将蛋白转至PVDF膜上,待转膜完成后用5%脱脂乳封闭液浸润膜,4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下封闭作用2小时;TBST溶液反复清洗多次,加入1:5000稀释anti-his的IgG一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下过夜孵育抗体;次日回收抗体,TBST溶液反复清洗膜,再加入1:5000稀释带有HRP标签的anti-IgG二抗,室温避光孵育2小时;回收抗体,TBST溶液反复清洗膜,曝光仪器下加入ECL显色液,手动曝光约2分钟。Western Blot验证结果如图5所示,结果显示:纯化蛋白样品在43 kDa处有明显条带,证明纯化的蛋白质为带有His标签的目的蛋白。

[0113] 综上所述,本发明成功构建了用于获取靶标蛋白的大肠杆菌原核表达载体,并验证了表达蛋白CD169为不可溶的包涵体沉淀,明确了后续纯化实验的流程,通过亲和层析镍柱将表达蛋白分离纯化,聚丙烯酰胺凝胶电泳验证了纯化的效果,Western Blot验证了纯化蛋白的正确性,得到了大量纯度较高的靶标蛋白质,为后续筛选实验提供了实验材料。

[0114] 实施例2、靶向性多肽片段的6轮固相筛选

[0115] 1、靶标蛋白透析复性

[0116] 将分离纯化的靶标蛋白装入透析袋中经尿素梯度透析,将蛋白缓慢透析复性并去除蛋白溶液中的多余组分,得到含有靶标蛋白的PBS溶液,因透析过程中蛋白液体体积发生变化,再次使用BCA法测定透析后蛋白溶液浓度,并调整浓度至1 mg/mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

[0117] 2、直接包被法处理固相基质

[0118] 靶标蛋白溶液根据筛选需求使用包被缓冲液稀释成不同浓度梯度的包被液,使用细胞培养6孔板作为固相基质,将包被液每孔1 mL加入6孔板中,使液体均匀覆盖孔底部,4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下包被过夜或10小时;次日将包被液体倒出,并在洁净滤纸上拍净残余液体,加入0.1% TBST溶液1.5 mL清洗包被孔,清洗后加入1 mL BSA蛋白封闭液,4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下封闭2小时,完成后去除封闭液再次清洗,靶标蛋白包被即可完成。

[0119] 3、噬菌体展示随机12肽库噬菌体滴度测定

[0120] 取1 μL 原始噬菌体库(来源于NEB公司的噬菌体展示随机12肽库试剂盒,噬菌体展示随机12肽库试剂盒Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit是NEB公司的产品,商品货号:#E8110S),10倍稀释至 10^{-10} 每个梯度取10 μL 与200 μL 宿主菌大肠杆菌ER2738培养菌液混匀室温静置5分钟,使噬菌体侵染宿主菌,加入事先预热至45 $^{\circ}\text{C}$ 的上层琼脂5 mL,快速混匀并倒入37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的Xgal-IPTG平板制作双层平板,待上层琼脂凝固后,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培

养至少12小时,检查平板蓝色噬菌斑数量并计算噬菌体滴度,噬菌体滴度约为 5.0×10^{12} pfu/ μ L。

[0121] 4、六轮固相筛选多肽片段

[0122] 根据测定滴度取噬菌体展示随机12肽库(来源于NEB公司的噬菌体展示随机12肽库试剂盒)1 μ L,加入999 μ L TBS溶液制备1 mL浓度为 5×10^9 pfu/mL的筛选噬菌体液体,将其加入第1轮包被完成的培养板中,室温缓慢振荡2.5小时,使噬菌体展示多肽充分结合靶标蛋白;结合完成后倒掉噬菌体筛选液体,加入1.5 mL的0.1% TBST溶液多次清洗,去除非特异性结合及结合较差的噬菌体;加入1 mL甘氨酸洗脱缓冲液,室温作用至少20分钟,将结合的噬菌体洗脱收集,再加入150 μ L中和缓冲液中和反应,所得液体即为1轮筛选噬菌体肽库洗脱液;混匀后取1 μ L洗脱液梯度稀释至 10^{-10} 做双层平板,做法与步骤3中一致;随后将洗脱液混匀取一半扩增培养作为下一轮筛选的噬菌体随机12肽库使用。随着筛选的次数逐步减少包被靶标蛋白的浓度逐步降低:1轮筛选靶标蛋白浓度为100 μ g/mL、2轮筛选靶标蛋白浓度为75 μ g/mL、3轮筛选靶标蛋白浓度为50 μ g/mL、4轮筛选靶标蛋白浓度为25 μ g/mL、5轮筛选靶标蛋白浓度为15 μ g/mL、6轮筛选靶标蛋白浓度为10 μ g/mL,增加清洗用TBST溶液中吐温-20的含量,减少噬菌体结合时间,以此增加筛选噬菌体展示多肽片段与靶标蛋白的特异性结合,6轮筛选噬菌体滴度测定的双层平板结果如图6所示。

[0123] 5、筛选噬菌体ELISA检验蛋白结合力

[0124] 末轮筛选洗脱的噬菌体经BSA蛋白负选后,回收并制作双层平板,待培养出蓝色噬菌斑后,选取噬菌斑数量小于100个的平板随机挑取45个蓝色噬菌斑,每个挑取的噬菌斑使用液体培养基并加入宿主菌扩大培养4.5小时,离心沉降后获得扩增噬菌体溶液;使用靶标蛋白和BSA蛋白包被96孔板,将45个噬菌体分为靶标蛋白实验组、BSA阴性对照组,另设不加噬菌体的空白对照组,包被完成后,加入噬菌体结合2小时,清洗并加入anti-M13噬菌体单克隆抗体孵育,随后加入TMB显色液作用30分钟,加入中止液并使用酶标仪在450nm处检测吸光值;以空白组数值的2~3倍作为阳性,并对照阴性、空白对照组,ELISA筛选所得噬菌体与靶标蛋白CD169及BSA蛋白的结合力。ELISA检测结果如图7所示,“*”表示靶标蛋白CD169组与BSA蛋白对照组间显著性差异, $P < 0.05$ 。最终选取了21个结合力较强的噬菌体提取DNA并测序。

[0125] 6、筛选噬菌体DNA提取测序

[0126] 将选取的21个噬菌体扩增培养并离心沉降,再次离心收集后弃掉上清液,加入100 μ L碘化物溶液重悬沉淀,并加入250 μ L无水乙醇混匀室温作用10分钟;离心后加入200 μ L 70%乙醇溶液重悬沉淀,再次离心后弃上清,短暂干燥去除乙醇溶液;30 μ L TE溶液重悬沉淀,所得液体即为噬菌体DNA模板,4 $^{\circ}$ C暂存;使用NanoDrop2000仪器测定所得噬菌体DNA模板浓度。将21个噬菌体DNA模板封装并测序。测序结果如图8所示,结果显示:在随机12肽基因编码处对比21个模板发现测序结果高度一致,证明筛选所得噬菌体特异性较高。

[0127] 7、多肽CD169-T1的获得

[0128] 将筛选噬菌体DNA测序结果进行分析,按照特定方式翻译成氨基酸序列,得到多肽片段,其氨基酸序列为APRLSHHIAHHH(序列2),将序列2所示的多肽命名为CD169-T1。

[0129] 8、带有化学荧光标签(罗丹明B)的多肽CD169-T1的化学合成

[0130] 为了验证多肽CD169-T1的靶向性,委托上海楚肽公司化学合成N末端添加人工合

成化学荧光标签罗丹明B(Rhodamine B)的多肽CD169-T1,罗丹明B化学式为 $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$,得到带有化学荧光标签(罗丹明B)的多肽CD169-T1(图9)。

[0131] 综上所述,本发明使用噬菌体展示技术和固相筛选法成功筛选得到一条与靶标蛋白(CD169受体蛋白)结合力较强的多肽CD169-T1。

[0132] 实施例3、多肽片段CD169-T1的靶向性验证

[0133] 1、多肽CD169-T1与靶标蛋白结合力检测

[0134] 将靶标蛋白(实施例1制备的CD169蛋白)、BSA蛋白(Biofroxx公司,货号:4240,CAS号:9048-46-8)和带有His标签的金黄色葡萄球菌TRAP蛋白(TRAP蛋白编码基因的GenBank ID为GU475118.1),以每孔不同浓度(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别包被孔壁为黑色的96孔板,用带有化学荧光标签(罗丹明B)的多肽CD169-T1分别与三种蛋白结合1小时,TBST溶液多次清洗未结合多肽,酶标仪检测各实验组的化学荧光,荧光值越高则结合力越强,以此检测CD169-T1多肽片段与靶标蛋白的结合力并检测多肽片段CD169-T1是否与His标签具有交叉反应。所用的96孔板孔壁为黑色,可有效避免相邻孔荧光影响,增加检测准确度。

[0135] 多肽CD169-T1与靶标蛋白CD169、TRAP蛋白及BSA蛋白的结合力检测结果如图10所示,结果显示:多肽CD169-T1不与BSA蛋白结合,在靶标浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下,与靶标蛋白CD169的结合力高于TRAP蛋白。

[0136] 2、多肽CD169-T1靶向巨噬细胞CD169受体的免疫荧光检测

[0137] 将牛源肾细胞MDBK、鼠源巨噬细胞RAW264.7(诱导型,induced)、鼠源巨噬细胞RAW264.7(未诱导型,uninduced)分别接种至细胞培养用24孔板中并放入圆形细胞爬片,培养一段时间待细胞贴附生长后,轻轻弃去培养基,加入PBS轻轻晃动培养皿清洗2次,弃去PBS。清洗完毕后加入浓度为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CD169-T1多肽溶液1 mL与细胞避光共孵育2小时,随后PBS清洗3次。加入4%多聚甲醛溶液固定细胞,室温静置30分钟;使用PBS清洗3次,加入带有化学荧光标签(罗丹明B)的多肽CD169-T1避光共孵育30分钟;PBS清洗数次,弃去清洗液加入0.1% Triton-100,室温静置15分钟,增强细胞膜通透性;PBS清洗数次,再加入DAPI染液100 μL 室温避光孵育20分钟,PBS清洗数次;随后调整荧光显微镜对染色细胞进行观察。

[0138] 结果如图11所示,镜下观察结果显示,3种细胞核标记为蓝色荧光,并且仅在诱导型RAW264.7巨噬细胞膜位置检出多肽CD169-T1携带的橙红色荧光,说明多肽CD169-T1具有特异性,结合了膜表面的受体。证明本发明筛选的多肽CD169-T1具有靶向巨噬细胞CD169受体的能力。

[0139] 实施例4、重组蛋白CD169-T1-TRAP的制备及其应用

[0140] 一、重组蛋白CD169-T1-TRAP的制备

[0141] 1、重组表达载体的构建

[0142] 将序列3所示的DNA分子插入pET-28a(+)载体的BamH I(NEB公司,货号:R3136T)和Hind III(NEB公司,货号:R3104T)酶切位点间,得到重组表达载体pET-28a(+)-CD169-T1-TRAP。

[0143] 重组表达载体pET-28a(+)-CD169-T1-TRAP的结构示意图如图12所示,该重组表达载体pET-28a(+)-CD169-T1-TRAP表达N端携带6 \times His标签且C端携带GFP标签和6 \times His标签

(所有标签序列均为载体自带)的重组蛋白CD169-T1-TRAP(重组蛋白CD169-T1-TRAP的氨基酸序列如序列4所示)。

[0144] 重组表达载体pET-28a(+)-CD169-T1-TRAP经限制酶酶切鉴定结果无误(图13),在双酶切泳道中出现5300bp和594bp两条条带,分别对应载体质粒和添加外源基因片段大小。

[0145] 2、重组蛋白的诱导表达

[0146] 通过热激法将重组表达载体pET-28a(+)-CD169-T1-TRAP转化至宿主菌株BL21(DE3)中,通过载体抗性基因筛选转化菌株并添加IPTG诱导表达。经诱导表达后对重组蛋白进行纯化,因重组蛋白N端和C端分别添加了6×His标签,通过亲和层析镍柱结合即可分离纯化重组蛋白。纯化后的重组蛋白通过浓度梯度透析法将蛋白溶液中的有毒有害物质分离,并缓慢复性以制备免疫重组蛋白抗原。

[0147] 将纯化后的重组蛋白进行 Western blot 分析,以验证重组蛋白在复性后的免疫原性,结果重组蛋白在22 kDa处出现明显可见的单一条带(图14),与预期相符,说明重组蛋白表达成功且免疫原性良好。

[0148] 二、靶向多肽在金黄色葡萄球菌TRAP抗原递送中的应用

[0149] 1、在24孔板中加入细胞爬片,培养小鼠巨噬细胞RAW264.7(未诱导型)至细胞生长密度约80%,去除培养液并使用PBS溶液清洗1次。

[0150] 2、将步骤一中重组蛋白CD169-T1-TRAP以1 mg/mL浓度与RAW264.7细胞共孵育,37℃结合2小时。

[0151] 3、将液体去除并清洗细胞,再加入4%多聚甲醛溶液浸润爬片,室温固定15分钟。

[0152] 4、使用PBS溶液清洗3次,加入DAPI核酸染液50 μL,室温避光孵育20分钟;PBS溶液清洗数次并使用一次性注射器针头小心取出细胞爬片,在洁净载玻片上滴加PBS溶液并将细胞爬片倒扣在载玻片上,去除气泡并封片,使用荧光显微镜观察。

[0153] 结果如图15所示,结果显示:小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞核染色后在镜下呈蓝色荧光,而重组蛋白CD169-T1-TRAP因携带GFP绿色荧光标签在镜下呈绿色荧光,绿色荧光与蓝色荧光明显颜色重合并且绿色围绕蓝色细胞核分布,证明CD169-T1-TRAP在巨噬细胞膜周围聚集,也证明了CD169-T1可有效将携带的金黄色葡萄球菌TRAP蛋白递送至巨噬细胞,显示了CD169-T1靶向多肽在抗原递送应用中的巨大作用。

[0154] 实施例5、重组蛋白CD169-T1-TRAP金黄色葡萄球菌疫苗的应用

[0155] 一、混合疫苗制备

[0156] 吸取2.5 mL重组蛋白CD169-T1-TRAP溶液(溶剂为PBS,终浓度为2.00 mg/mL)与氢氧化铝佐剂(美国通用化学集团公司)按照体积比为1:1的比例充分混合,得到混合疫苗(CD169-T1-TRAP)。

[0157] 吸取2.5 mL重组蛋白TRAP-Fc γ 溶液(溶剂为PBS,终浓度为2.00 mg/mL)与氢氧化铝佐剂(美国通用化学集团公司)按照体积比为1:1的比例充分混合,得到混合疫苗(TRAP-Fc γ)。

[0158] 吸取2.5 mL TRAP蛋白溶液(溶剂为PBS,终浓度为2.00 mg/mL)与氢氧化铝佐剂(美国通用化学集团公司)按照体积比为1:1的比例充分混合,得到混合疫苗(TRAP)。

[0159] 二、奶牛免疫

[0160] 用CMT法检测患有隐性乳房炎的奶牛,然后从中筛选出20头由金黄色葡萄球菌感

染导致患有严重隐性乳房炎且临近干奶期的奶牛。将20头奶牛随机分为四组,每组5头奶牛进行免疫,每组免疫疫苗具体如下:

[0161] 第一组(实验靶向免疫组):混合疫苗(CD169-T1-TRAP)。

[0162] 第二组(对照靶向免疫组):混合疫苗(TRAP-Fcr)。

[0163] 第三组(未靶向免疫组):混合疫苗(TRAP)。

[0164] 第四组(空白对照组):PBS。

[0165] 各免疫组均进行两次免疫:第一次免疫是在奶牛干奶期前14天进行肌肉注射。奶牛尾静脉采血分离血清冷冻-20℃保存。第二次免疫在奶牛干奶的当天进行乳头管注射免疫。采用一次性乳头管封闭针进行注射,注射完即可进行奶牛的正常乳头封闭程序。各免疫组每次免疫剂量均为5 mg/头。

[0166] 三、靶向多肽介导金黄色葡萄球菌TRAP抗原对奶牛感染金黄色葡萄球菌的保护作用

[0167] 第一次免疫后第0 d和第90 d天取牛乳样品(乳样)进行分菌实验,金黄色葡萄球菌菌落在高盐甘露醇平板培养基上呈金黄色,提取菌株基因组DNA并利用PCR扩增nuc基因,扩增出nuc基因的菌株即为金黄色葡萄球菌。统计检出率(阳性样本/总样本数)并使用体细胞仪测定免疫前后免疫组和对照组乳样中的体细胞数。

[0168] 结果表明:免疫90 d后空白对照组乳样金黄色葡萄球菌的检出率为80%; CD169-T1-TRAP免疫组乳样金黄色葡萄球菌的检出率为20%, TRAP-Fcr免疫组乳样金黄色葡萄球菌的检出率为20%, TRAP免疫组乳样金黄色葡萄球菌的检出率为40%(图16)。金黄色葡萄球菌在CD169-T1-TRAP免疫组与TRAP-Fcr免疫组乳样中的检出率均显著低于TRAP免疫组。此外, CD169-T1-TRAP免疫组免疫0 d时的体细胞数大于 4.0×10^5 个/mL,免疫90 d后的体细胞数小于 3.3×10^5 个/mL,而TRAP免疫组免疫0 d时的体细胞数大于 4.0×10^5 个/mL,免疫90 d后的体细胞数大于 4.0×10^5 个/mL。以上结果说明:靶向多肽介导金黄色葡萄球菌TRAP抗原对奶牛感染金黄色葡萄球菌具有更好的保护作用。

[0169] 四、牛血清中总IgG抗体效价检测

[0170] 以TRAP蛋白作为检测抗原,采用间接ELISA法检测第一次免疫后第0 d、7 d、14 d、28 d、60 d和90 d各免疫组以及对照组的血清抗体滴度。

[0171] 结果表明:第一次免疫后0 d,各免疫组奶牛血清中抗体滴度均为1:256。第一次免疫7 d后,TRAP免疫组的奶牛血清中抗体滴度为1:512,CD169-T1-TRAP和TRAP-Fcr免疫组的奶牛血清中抗体滴度同样为1:512;第一次免疫14 d后,血清抗体滴度均显著升高,CD169-T1-TRAP和TRAP-Fcr免疫组奶牛血清中抗体滴度均为1:2048,未进行靶向的TRAP免疫组奶牛血清中抗体滴度为1:1024;第一次免疫28 d后,TRAP-Fcr免疫组奶牛血清中抗体滴度为1:8192,CD169-T1-TRAP免疫组奶牛血清中抗体滴度为1:(4096-8192);第一次免疫60 d后,免疫各组的血清抗体滴度呈现下降趋势(图17)。

[0172] 五、牛乳中IgA抗体检测

[0173] 以TRAP蛋白作为检测抗原,采用间接ELISA法检测奶牛第一次免疫28 d后的牛乳样品中的IgA抗体水平。

[0174] 结果表明:与空白对照组相比,各免疫组所分泌的IgA抗体水平均有所升高,其中CD169-T1-TRAP和TRAP-Fcr免疫组分泌的IgA抗体水平均显著高于TRAP免疫组,CD169-T1-

TRAP免疫组分泌的IgA抗体水平高于TRAP-Fc γ 免疫组(图18)。说明相对于TRAP蛋白,CD169-T1-TRAP蛋白与TRAP-Fc γ 蛋白能更好地引起机体产生IgA。

[0175] 六、牛血清中IgG亚类抗体检测

[0176] 以TRAP蛋白作为检测抗原,采用间接ELISA法检测奶牛第一次免疫28 d后的牛血清中的IgG亚类抗体水平。

[0177] 结果表明:在IgG1抗体水平检测中发现,与空白对照组相比,各组抗原蛋白引起的各个抗体亚类均得到了不同程度的升高,其中CD169-T1-TRAP与TRAP-Fc γ 免疫组的IgG1抗体水平均高于TRAP免疫组,说明CD169-T1-TRAP靶向蛋白抗原与TRAP-Fc γ 靶向蛋白抗原保持了原有良好的体液免疫应答并有提高(图19)。在IgG2抗体水平检测中发现,CD169-T1-TRAP免疫组的IgG2抗体水平显著高于TRAP免疫组,说明CD169-T1-TRAP靶向蛋白抗原能有效诱导细胞免疫应答(图20),并且CD169-T1-TRAP蛋白在增强细胞免疫方面优于TRAP-Fc γ 蛋白。

[0178] 综上所述,用靶向重组蛋白与氢氧化铝佐剂混匀乳化免疫奶牛后,靶向重组蛋白CD169-T1-TRAP免疫组与TRAP-Fc γ 免疫组所诱导的特异性抗体滴度高于TRAP免疫组,诱导机体产生特异性IgA、IgG1和IgG2的抗体水平均高于TRAP免疫组,CD169-T1-TRAP免疫组诱导的IgG2抗体水平显著高于TRAP-Fc γ 蛋白免疫组。由此可见,相对于TRAP蛋白,CD169-T1-TRAP蛋白与TRAP-Fc γ 蛋白在诱导机体产生更高的体液免疫应答的同时,也诱导机体产生了更高水平的细胞免疫应答,并且相对于TRAP-Fc γ 蛋白,CD169-T1-TRAP蛋白能诱导机体产生更高水平的细胞免疫应答。

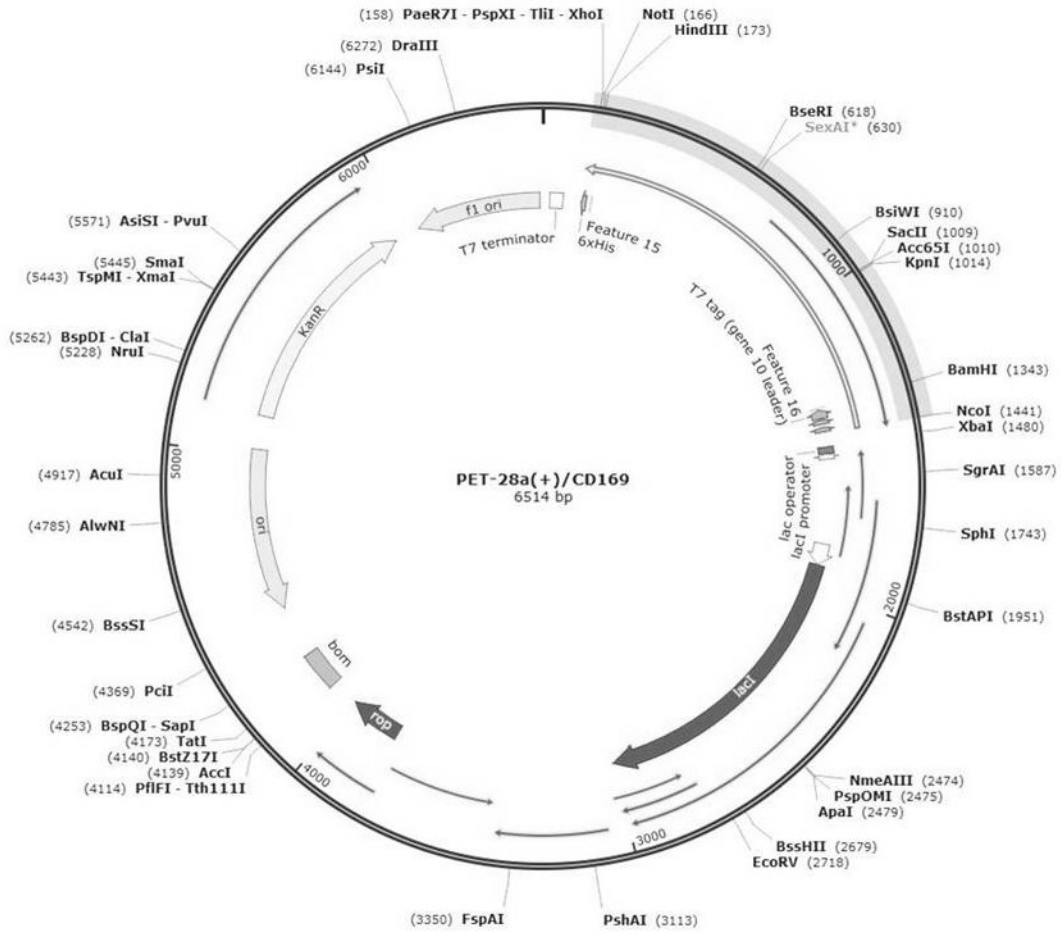


图 1

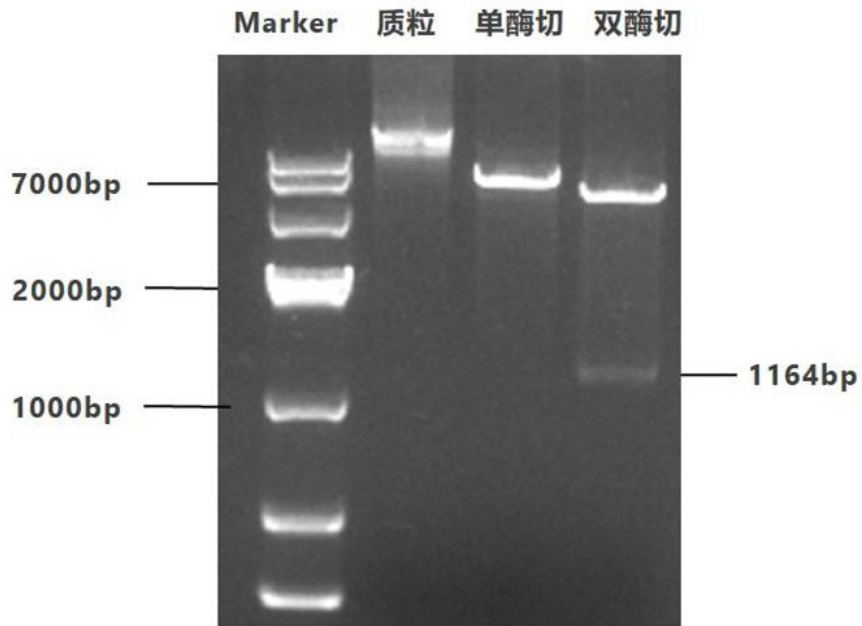


图 2

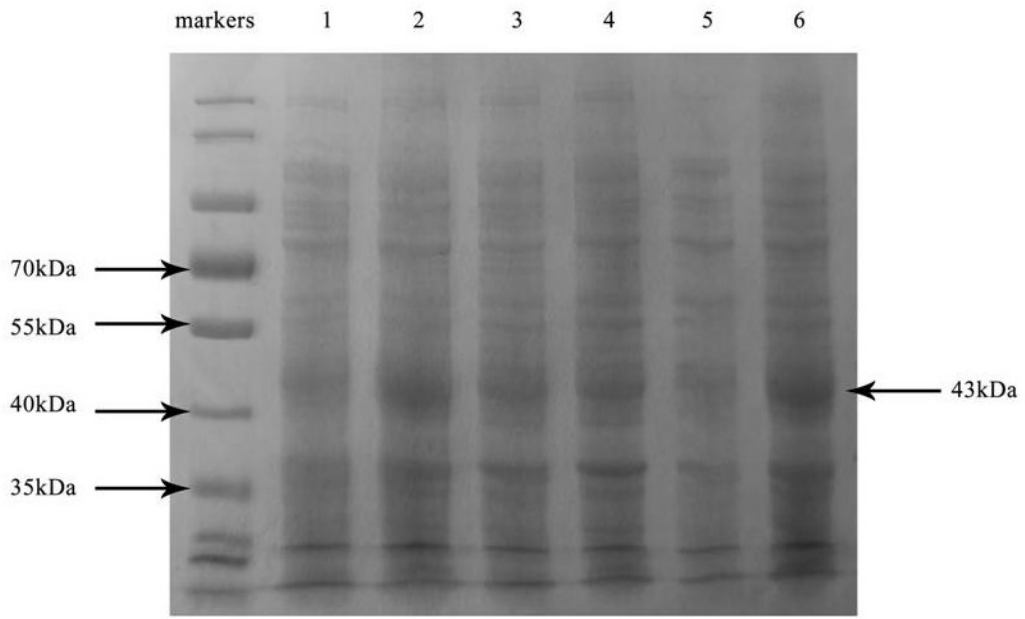


图 3

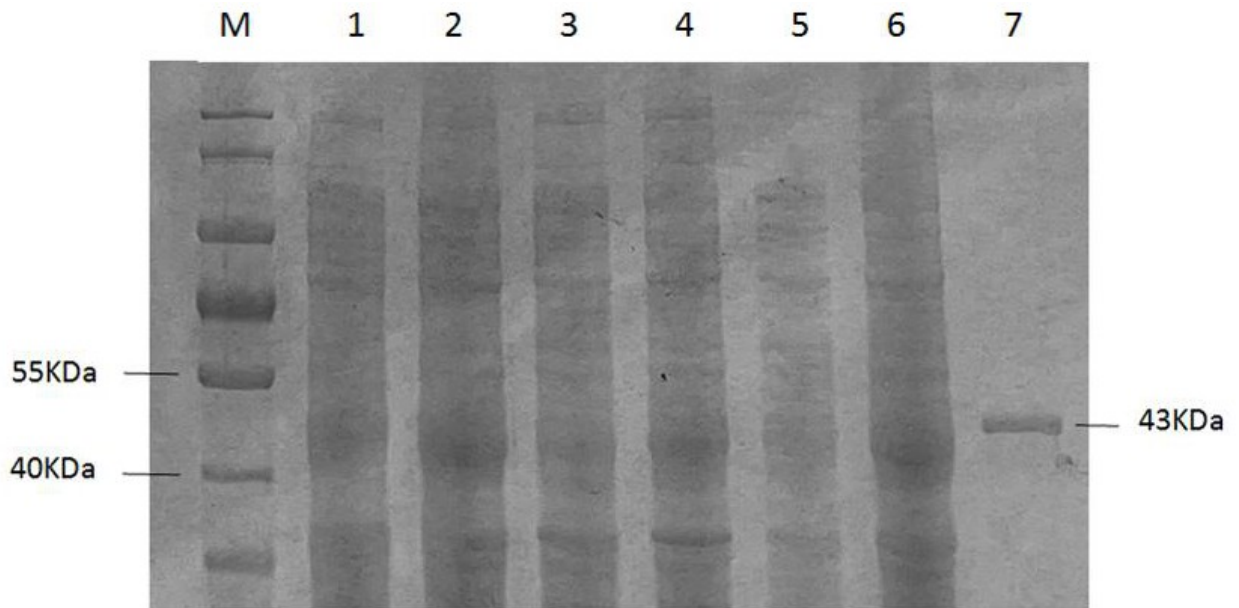


图 4

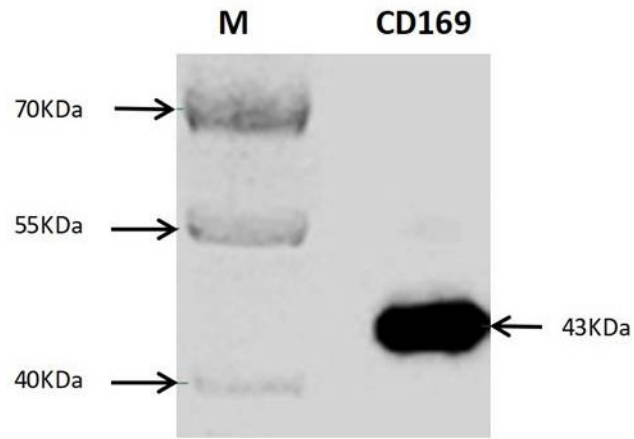


图 5

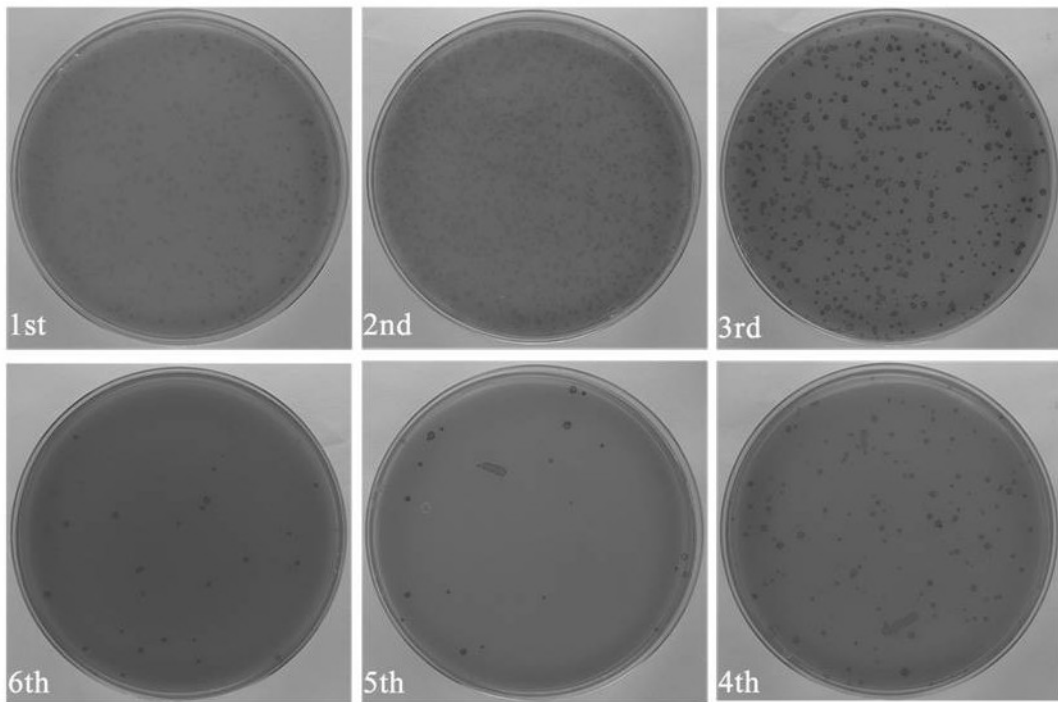


图 6

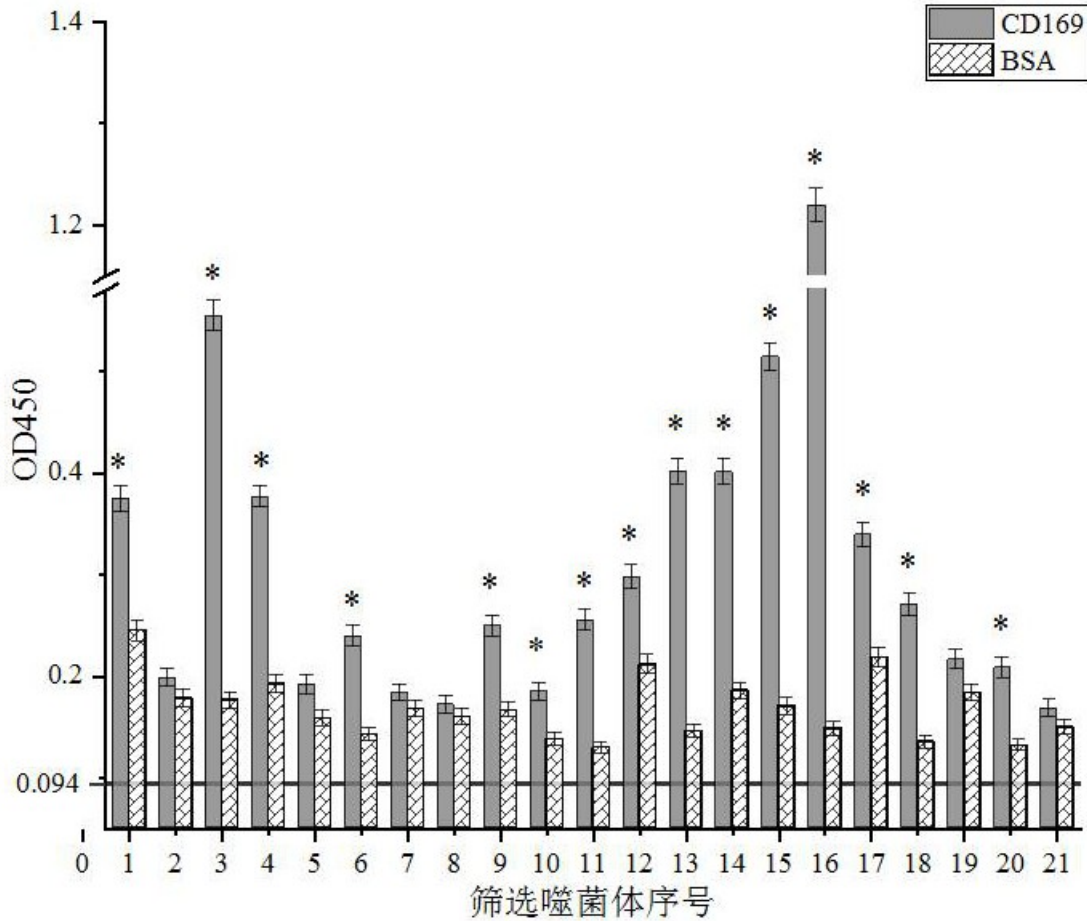


图 7

Species/Abbrv	Group Name	DNA Sequences	Translated Protein Sequences
1. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
2. Sequence 2		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
3. Sequence 3		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
4. Sequence 4		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
5. Sequence 5		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
6. Sequence 6		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
7. Sequence 7		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
8. Sequence 8		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
9. Sequence 9		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
10. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
11. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
12. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
13. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
14. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
15. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
16. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
17. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
18. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
19. Sequence 1		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
20. Sequence 2		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
21. Sequence 2		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC
22. Sequence 2-28 primer		ACAAC TTTCAAC AGTTTCGGCCGAACCTCCAC	ATGATGATGCGCAATATGATGACTAAGGC

图 8

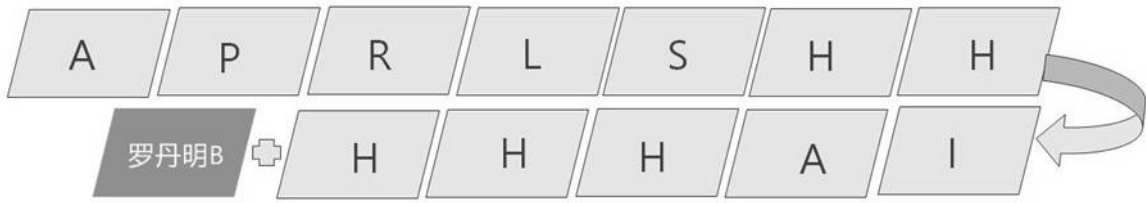


图 9

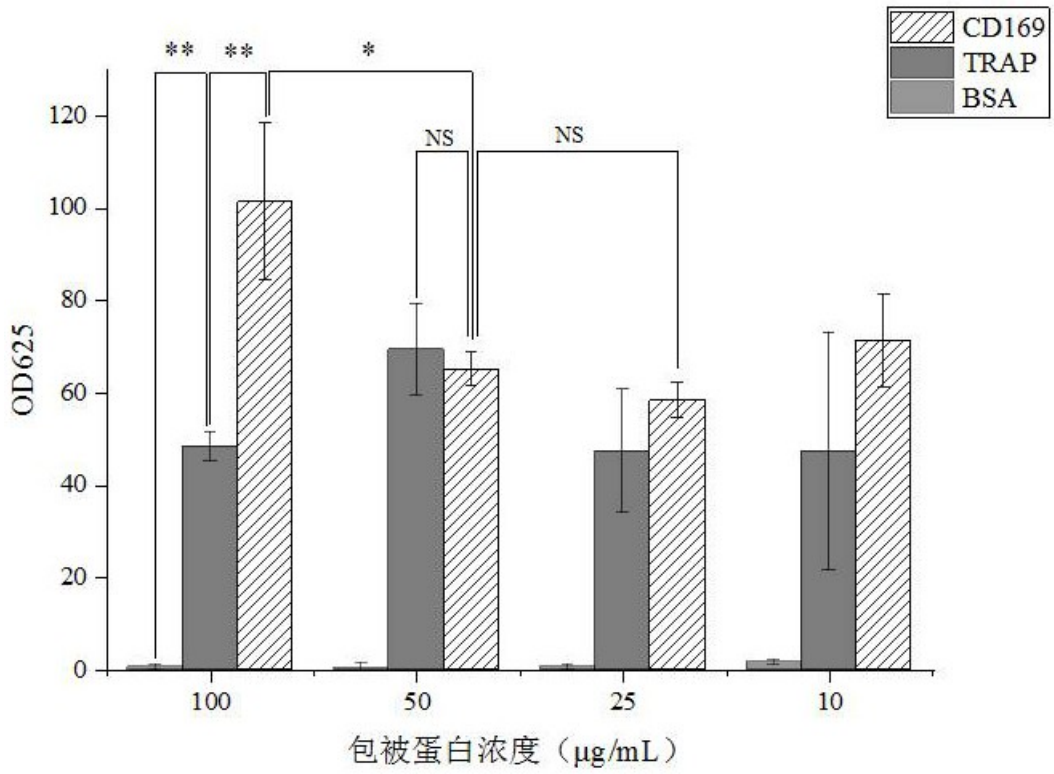


图 10

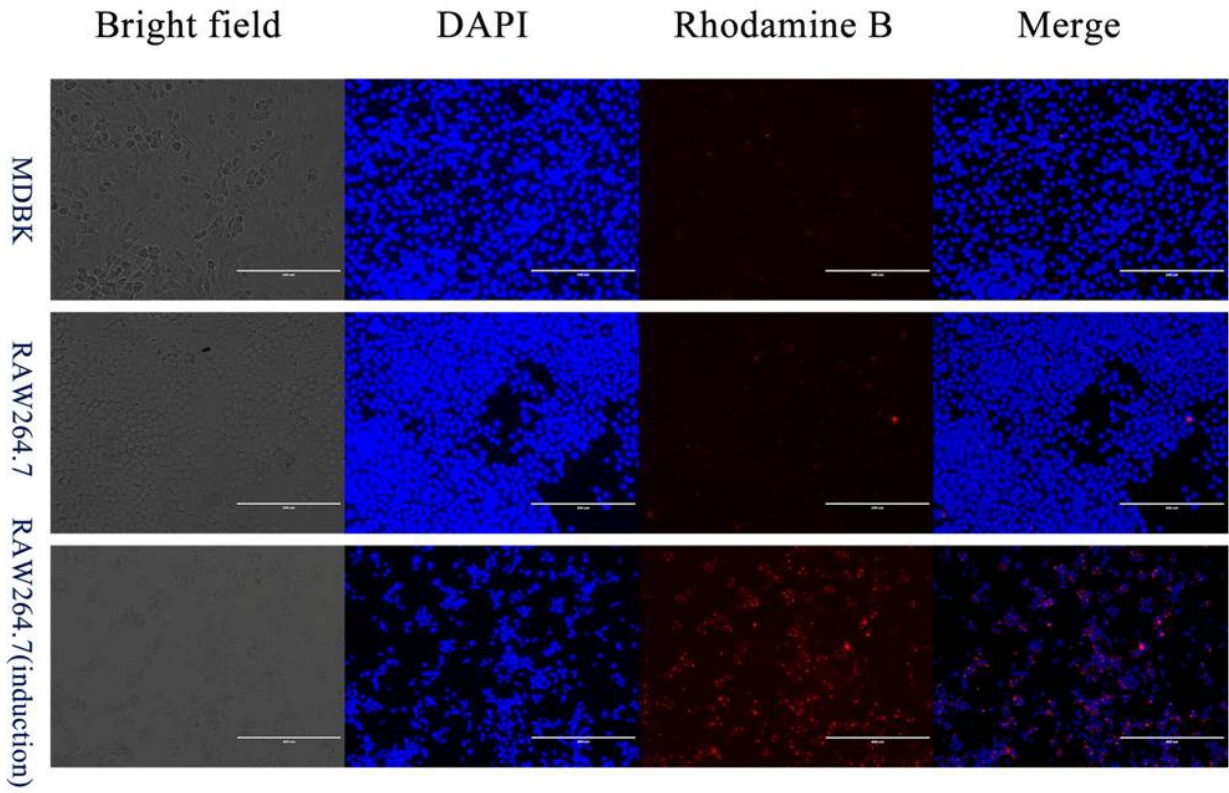


图 11

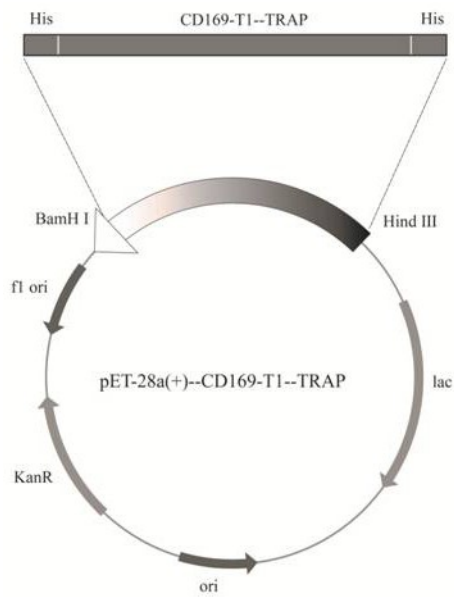


图 12

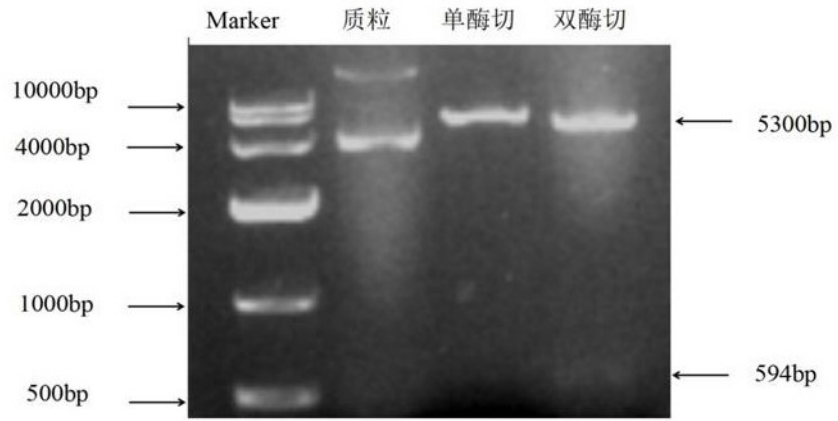


图 13

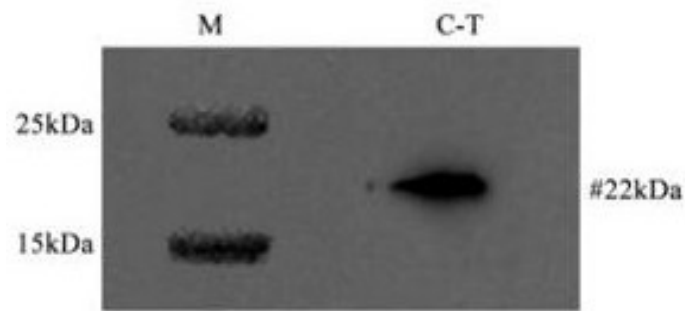


图 14

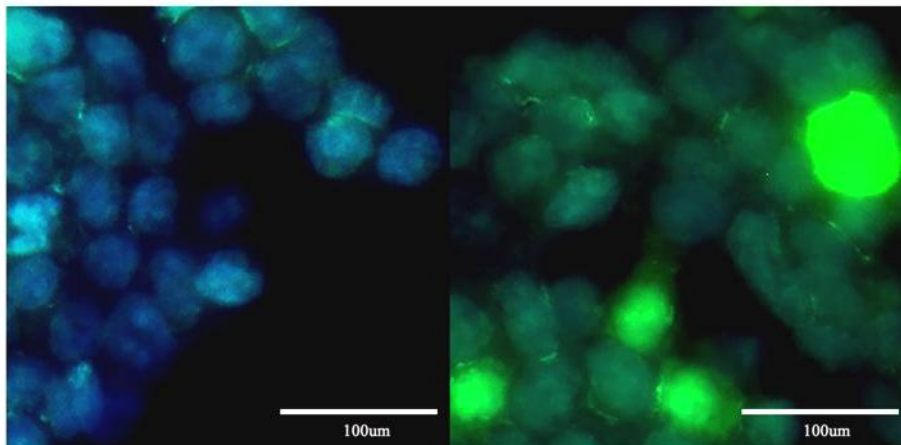


图 15

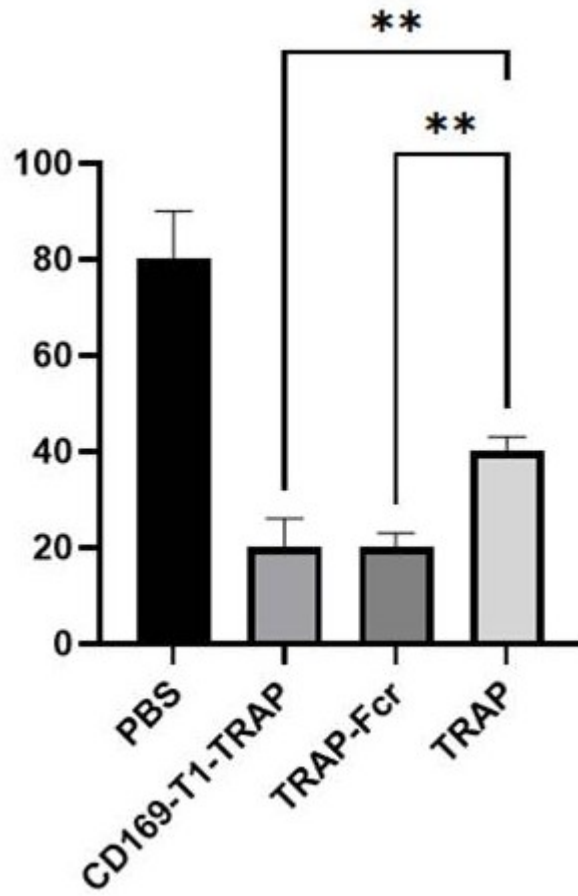


图 16

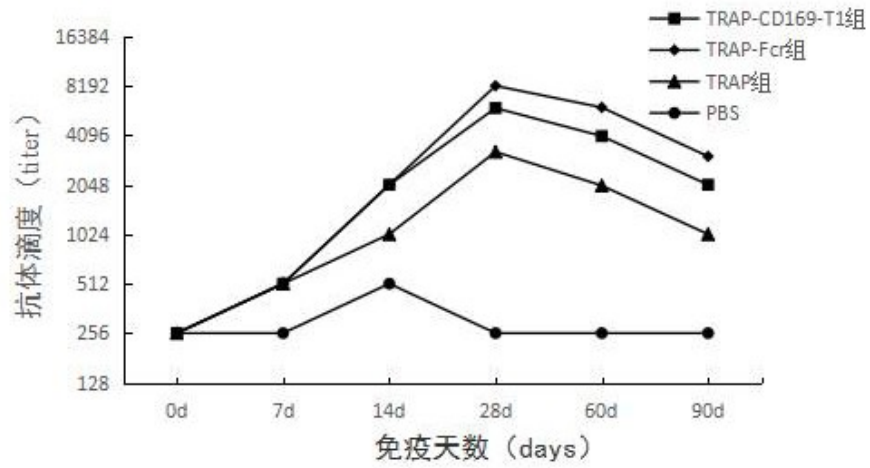


图 17

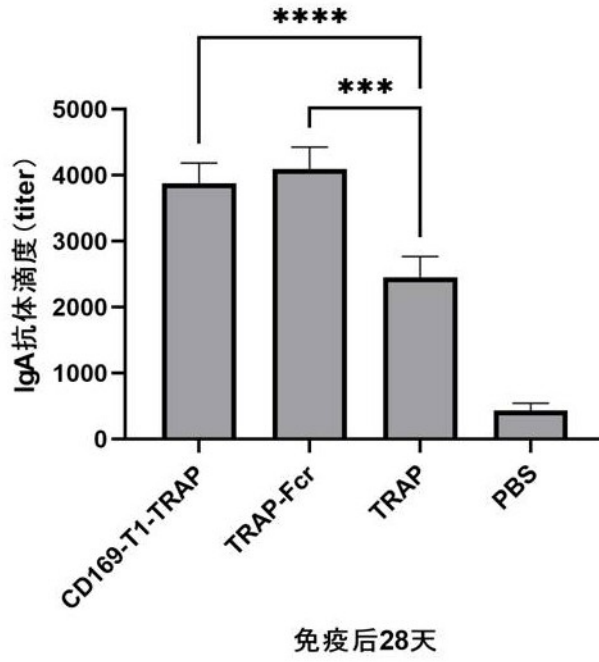


图 18

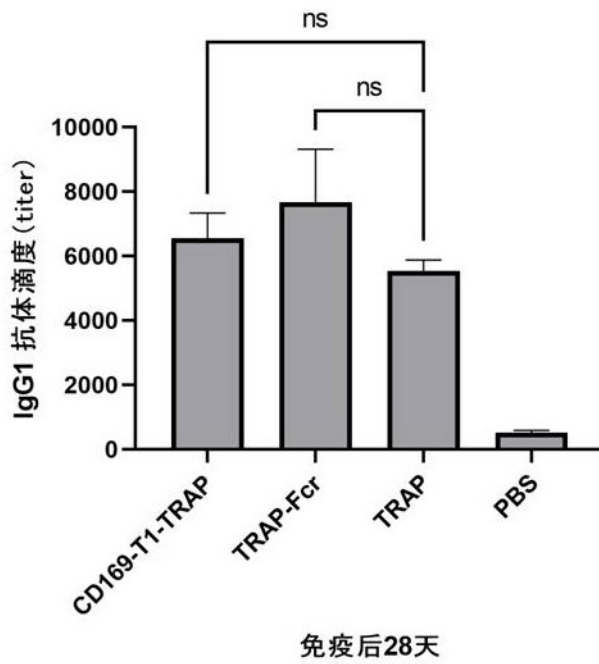


图 19

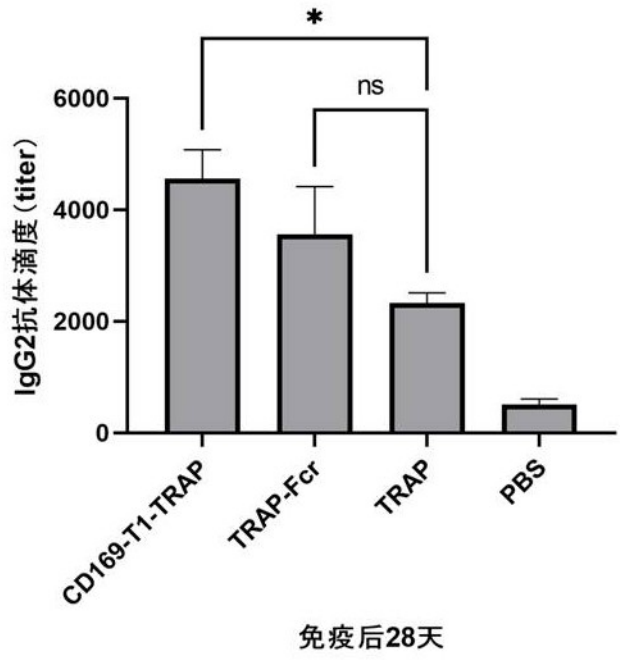


图 20