



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114225020 B

(45) 授权公告日 2023.05.02

(21) 申请号 202111674817.3

A61P 37/04 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.31

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 102549014 A, 2012.07.04

申请公布号 CN 114225020 A

审查员 周怡婷

(43) 申请公布日 2022.03.25

(73) 专利权人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市天河区黄埔大道西601号

(72) 发明人 张奕 刘雯 周小雁 汪翔 薛巍

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

专利代理师 苏运贞

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

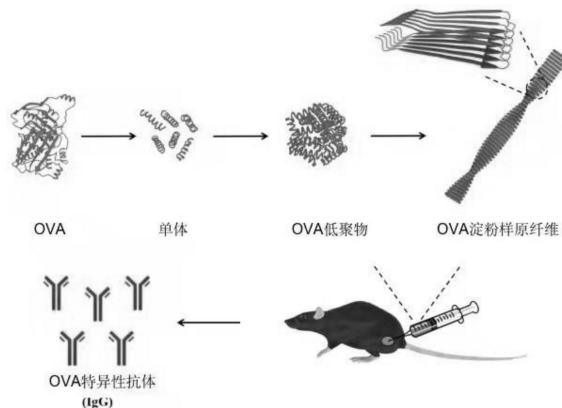
权利要求书1页 说明书12页 附图13页

(54) 发明名称

一种OVA淀粉样蛋白原纤维及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种OVA淀粉样蛋白原纤维及其制备方法与应用。属于生物医学工程材料领域。一种OVA淀粉样蛋白原纤维的制备方法,包括如下步骤:(1)将卵清蛋白(OVA)溶于稀盐酸中,透析,冷冻干燥,得到海绵状的OVA冻干样品;(2)将海绵状的OVA冻干样品溶于稀盐酸中,加入NaCl,调节pH至2,得到混合溶液;将混合溶液于密封条件下水浴加热,终止反应,得到OVA淀粉样蛋白原纤维。本发明通过抗原卵清蛋白组装结构发生变化,实现了免疫效果的增强的目的。本发明制备的OVA淀粉样蛋白原纤维具有低成本、无添加剂的优点,为疫苗的设计提供了新的思路。



1. 一种OVA淀粉样蛋白原纤维在制备疫苗制剂中的应用,其特征在于,所述的OVA淀粉样蛋白原纤维的制备方法包括如下步骤:

(1) 将卵清蛋白溶解在pH值为2的稀盐酸中,使得卵清蛋白在体系中的质量浓度为5%,并在4℃环境下用截留分子量为3000D的透析袋透析1周,随后进行冷冻干燥,冻干后得到海绵状的OVA冻干样品;

(2) 将海绵状的OVA冻干样品以2%的质量浓度溶于pH值为2的稀盐酸中,加入氯化钠,并加入浓度为1 M的盐酸,调节溶液pH值为2,得到混合溶液,所述的氯化钠在混合溶液中的终浓度为50 mM;将混合溶液加入到反应容器中,密封,在60℃下水浴加热,反应24 h后取出混合溶液,放置在冰水混合物中,以终止反应,得到OVA淀粉样蛋白原纤维。

## 一种OVA淀粉样蛋白原纤维及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学工程材料领域,特别涉及一种OVA淀粉样蛋白原纤维及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 在疫苗的研发过程中,设计出能够有效刺激人体免疫系统,引发保护性或治疗性免疫应答的疫苗,并同时兼顾安全性,是首要目的。为了实现这一目的,疫苗构建方法的不断优化显得尤为重要。抗原以及递送载体是疫苗极为重要的组成部分,也是当前疫苗领域的研究热点。

[0003] 卵清蛋白(Ovalbumin,OVA),是目前各类疫苗的相关研究中常用的模型蛋白抗原。在现有的大量关于纳米疫苗构建的研究中,通常借助各类递送载体负载OVA,同时辅以各类免疫佐剂,从而构建出多组分工程化纳米疫苗。尽管大部分被报道的这一类纳米疫苗能够在诱导免疫应答预防疾病甚至治疗癌症方面取得一定的效果,但加入多种疫苗载体和佐剂的多组分疫苗设计往往过于复杂而难以标准化和产业化。

### 发明内容

[0004] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种OVA淀粉样蛋白原纤维的制备方法。

[0005] 本发明的另一目的在于提供通过上述制备方法制备得到的OVA淀粉样蛋白原纤维。

[0006] 本发明的再一目的在于提供上述OVA淀粉样蛋白原纤维的应用。

[0007] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0008] 一种OVA淀粉样蛋白原纤维的制备方法,包括如下步骤:

[0009] (1) 将卵清蛋白(OVA)溶于稀盐酸中,透析,冷冻干燥,得到海绵状的OVA冻干样品;

[0010] (2) 将海绵状的OVA冻干样品溶于稀盐酸中,加入NaCl,调节pH至2,得到混合溶液;将混合溶液于密封条件下水浴加热,终止反应,得到OVA淀粉样蛋白原纤维。

[0011] 步骤(1)中,所述的稀盐酸的pH值优选为1~5;更优选为2。

[0012] 步骤(1)中,所述的卵清蛋白在卵清蛋白和稀盐酸形成的体系中的质量浓度优选为1~10%。

[0013] 步骤(1)中,所述的透析所用的透析袋的截留分子量优选为3000~6000D;更优选为3000D。

[0014] 步骤(1)中,所述透析的条件优选为4℃透析6~8天;更优选为4℃透析7天。

[0015] 步骤(2)中,所述的稀盐酸的加入量优选为海绵状的OVA冻干样品和稀盐酸质量的1~3% (w/w);更优选为海绵状的OVA冻干样品和稀盐酸质量的2% (w/w)。

[0016] 步骤(2)中,所述的氯化钠在混合溶液中的终浓度为30~70mM;更优选为50mM。

[0017] 步骤(2)中,所述的调节pH至2的试剂优选为稀盐酸或NaOH。

- [0018] 步骤(2)中,所述的水浴加热的温度优选为40~70℃;更优选为60℃。
- [0019] 步骤(2)中,所述的水浴加热的时间优选为6~48h;更优选为24h。
- [0020] 步骤(2)中,所述的终止反应的方法优选为将混合溶液置于冰水混合物中终止反应。
- [0021] 一种OVA淀粉样蛋白原纤维,通过上述制备方法制备得到。
- [0022] 所述的OVA淀粉样蛋白原纤维在制备疫苗制剂中的应用。
- [0023] 一种疫苗制剂,包括上述OVA淀粉样蛋白原纤维。
- [0024] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:
- [0025] (1) 本发明以卵清蛋白(OVA)为模型抗原,通过工程化手段诱导OVA结构重组,促使其二级结构乃至三级、四级结构发生改变,进而制备得到OVA淀粉样蛋白原纤维。本发明制备得到的OVA淀粉样蛋白原纤维能够有效提高树突状细胞的内化率,并刺激树突状细胞表面MHC II分子、CD80分子和CD40的高表达,促进树突状细胞的增殖和成熟。另外,本发明的OVA淀粉样蛋白原纤维能够有效提高抗原在脾脏内的富集程度,且富集效果明显高于未经任何处理的OVA。此外,体内免疫接种实验,证明了OVA淀粉样蛋白原纤维可以作为一种不依赖免疫佐剂辅助的单组分疫苗,通过提高OVA特异性抗体的滴度,促进细胞因子分泌,实现免疫记忆效应、延长淋巴器官和皮下注射部位的抗原驻留时间来有效地增强OVA在体内引发的免疫应答。而且,以OVA淀粉样蛋白原纤维作为免疫接种的疫苗对机体的主要器官(心脏,肝脏,脾脏,肺,肾脏)无明显的毒副作用,生物安全性良好。
- [0026] (2) 本发明从疫苗抗原结构组装出发,提出新的纳米疫苗制备方法,在没有借助任何载体和佐剂的情况下,希望通过单纯的抗原工程化处理来增强其在体内引发的免疫应答,为新型疫苗开发提供了一种简便、低成本以及绿色安全性于一体的免疫原性增强化的纳米疫苗制备方法。
- [0027] (3) 本发明通过抗原卵清蛋白组装结构发生变化,实现了免疫效果的增强的目的。发明人通过一系列体内外实验评估了OVA淀粉样蛋白原纤维的免疫原性。并证明与未经任何处理的OVA相比,OVA淀粉样蛋白原纤维能够通过一系列途径,包括促进DCs细胞成熟,促进记忆T细胞的活化,提高OVA特异性抗体以及Th2型细胞因子的分泌,提高注射部位的驻留时间来有效提高OVA在体内引发的体液免疫应答,并且具有良好的生物安全性。本发明制备的OVA淀粉样蛋白原纤维具有低成本、无添加剂的优点,为疫苗的设计提供了新的思路。

## 附图说明

- [0028] 图1为OVA低聚物和OVA淀粉样蛋白原纤维的制备及免疫流程图。
- [0029] 图2为OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维光学显微镜和透射电子显微镜结果图。
- [0030] 图3为OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的粒径分布和电位结果图;其中,(a)为OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的粒径分布图;(b)为OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的电位结果图。
- [0031] 图4为OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的细胞毒性检测结果图;其中,(a)为OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的细胞存活率结果图;(b)为OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的细胞内化结果图;(c)为OVA、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维处理后的DC 2.4细胞中带有较强Cy5荧光的细胞占比结果图;(d)为经OVA、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维

处理后DC 2.4细胞的激光共聚焦共定位成像结果图。

[0032] 图5为BMDCs细胞分别经OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和LPS/OVA处理后的成熟相关分子的表达情况结果图；其中，(a)为BMDCs细胞表面MHC II分子的表达水平结果图；(b)为BMDCs细胞表面CD80分子的表达水平结果图；(c)为BMDCs细胞表面CD86分子的表达水平结果图。

[0033] 图6为免疫组化分析免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠脾脏内的抗原表达情况；其中，(a)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠脾脏内的抗原水平(黄色区域代表抗原)定性实物图；(b)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA2天后小鼠脾脏内抗原所占区域定量结果图；(c)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA7天后小鼠脾脏内抗原所占区域定量结果图。

[0034] 图7为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠的脾细胞增殖情况图。

[0035] 图8为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠体内脾细胞中DCs的成熟相关分子的表达情况结果图；其中，(a)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后树突状细胞表面MHC II的表达水平结果图；(b)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后树突状细胞表面CD40的表达水平结果图；(c)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后树突状细胞表面MHC II的流式细胞术散点图。

[0036] 图9为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠脾细胞中CD4<sup>+</sup>效应记忆性T细胞和CD8<sup>+</sup>效应记忆性T细胞的占比结果图；其中，(a)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠脾细胞中CD4<sup>+</sup>效应记忆性T细胞的百分比结果图；(b)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠脾细胞中CD8<sup>+</sup>效应记忆性T细胞的百分比结果图；(c)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠脾细胞中CD4<sup>+</sup>效应记忆性T细胞和CD8<sup>+</sup>效应记忆性T细胞的流式细胞术散点图(Q4为效应记忆T细胞区域)。

[0037] 图10为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠血清中OVA特异性免疫球蛋白IgG的抗体滴度结果图。

[0038] 图11为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠脾细胞悬液中IL-4及IL-10的分泌水平结果图；其中，(a)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠脾细胞悬液中IL-4的分泌水平结果图；(b)为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后小鼠脾细胞悬液中IL-10的分泌水平结果图。

[0039] 图12为免疫接种OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后经酶联免疫斑点试验检测小鼠脾细胞中分泌IL-4的密度结果图。

[0040] 图13为皮下接种OVA、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维后小鼠注射部位的活体荧光成像和平均Cy5荧光强度结果图；其中，(a)为皮下接种OVA、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维后小鼠注射部位的活体荧光成像结果图；(b)为皮下接种OVA、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维后小鼠注射部位的平均荧光强度(代表抗原含量)随接种时间的变化的结

果图；(c)为皮下接种OVA、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维144h后小鼠腹股沟淋巴结的荧光成像结果图。

[0041] 图14为皮下接种OVA、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维后主要器官(心脏,肝脏,脾脏,肺,肾脏)的切片观察图(比例尺为100 $\mu$ m)。

### 具体实施方式

[0042] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0043] 本发明的试剂和原料若无特别说明,均可通过市购得到。

[0044] 图1为OVA低聚物和OVA淀粉样蛋白原纤维的制备及免疫流程图。

[0045] 卵清蛋白(OVA)为固体粉末状,购于美国Sigma-Aldrich公司。

[0046] 实施例1:OVA淀粉样蛋白原纤维和OVA低聚物的制备

[0047] 1、OVA低聚物的制备

[0048] (1)将卵清蛋白(OVA)溶解在pH值为2的稀盐酸(卵清蛋白在体系中的质量浓度为5%)中,并在4 $^{\circ}$ C环境下透析1周,随后进行冷冻干燥,冻干后得到海绵状的OVA冻干样品;

[0049] (2)将海绵状的OVA冻干样品以2% (w/w)的质量浓度溶于pH值为2的稀盐酸中,加入氯化钠(终浓度为50mM),并加入少量浓度为1M的盐酸(在电子pH计监测的同时调节溶液pH值为2),得到混合溶液;将混合溶液加入到25mL小烧瓶中,使用橡胶塞密封,在60 $^{\circ}$ C下水浴加热,反应0.5h后取出少量混合溶液,放置在冰水混合物中,以终止反应,并将其保存于4 $^{\circ}$ C环境中,得到呈现微纳米球状颗粒的OVA低聚物,即为OVA低聚体。

[0050] 2、OVA淀粉样蛋白原纤维的制备

[0051] (1)将卵清蛋白(OVA)溶解在pH值为2的稀盐酸(卵清蛋白在体系中的质量浓度为5%)中,并在4 $^{\circ}$ C环境下用截留分子量为3000D的透析袋透析1周,随后进行冷冻干燥,冻干后得到海绵状的OVA冻干样品。

[0052] (2)将海绵状的OVA冻干样品以2% (w/w)的质量浓度溶于pH值为2的稀盐酸中,加入氯化钠(终浓度为50mM),并加入少量浓度为1M的盐酸(在电子pH计监测的同时调节溶液pH值为2),得到混合溶液;将混合溶液加入到25mL小烧瓶中,使用橡胶塞密封,在60 $^{\circ}$ C下水浴加热,反应24h后取出少量混合溶液,放置在冰水混合物中,以终止反应,得到呈现纳米纤维状的OVA淀粉样蛋白原纤维,即为OVA淀粉样蛋白原纤维。保存于4 $^{\circ}$ C环境中。

[0053] 1)OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的微观结构表征

[0054] 经图2倒置光学显微镜和透射电子显微镜(TEM)分析,从图2可以直观的看到:OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的不同拓扑结构;其中,OVA低聚体主要呈现颗粒状,为数百纳米的微球,其粒径约分布范围为20-50nm。OVA淀粉样蛋白原纤维的直径为50~100nm,长度10~50 $\mu$ m。

[0055] 2)未经任何处理的卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的粒径表征

[0056] 使用马尔文纳米激光粒度仪对未经任何处理的卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维进行表征。

[0057] 通过纳米激光粒度仪测量未经任何处理的卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体和OVA淀粉

样蛋白原纤维的平均水合粒径及Zeta电位,并分析数据。

[0058] 如图3(a)所示,相较于OVA低聚体和未经任何处理的卵清蛋白(OVA),OVA淀粉样蛋白原纤维的粒径更大,分布范围更窄。

[0059] 由图3(b)未经任何处理的卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的Zeta电位值可知,组装反应开始后,OVA的Zeta由负电位变为正电位。据此可以推测,随着OVA组装反应的进行,OVA的蛋白结构迅速发生改变,从而导致其电位由负转正。

[0060] 实施例2:OVA淀粉样蛋白原纤维的细胞毒性检测

[0061] 使用DC 2.4细胞(小鼠树突状细胞,购于ATCC)表征OVA淀粉样蛋白原纤维的细胞毒性。

[0062] (1)OVA淀粉样蛋白原纤维的细胞毒性检测

[0063] 使用DC 2.4细胞系表征OVA淀粉样蛋白原纤维的细胞毒性。首先,按照常规方法,使用RPMI 1640完全培养基(含10%胎牛血清)培养DC 2.4细胞。待细胞正常增殖且贴壁后,使用胰蛋白酶消化细胞,使用1640完全培养基终止消化,1000rpm离心后,去除上清液,使用1640完全培养基重悬细胞,获得DC 2.4细胞悬液。使用血球计数板对DC 2.4细胞计数后,将DC 2.4细胞稀释至 $1 \times 10^5$ 个细胞/mL的密度,并接种在96孔板中(每孔中加入100 $\mu$ L细胞悬液,即每孔细胞总数约为 $1 \times 10^4$ )。随后,将孔板在细胞培养箱中孵育(37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>)。待孵育时间达24h后,吸出孔板内的液体,每孔用PBS缓冲液(pH 7.4、10mM;下同)清洗2次后,分别加入100 $\mu$ L不同浓度的OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维溶液(使用1640完全培养基稀释,浓度梯度设置为0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.5mg/mL、1mg/mL、2mg/mL),每个浓度设置3个平行对照孔。同时,设置3个仅含细胞和1640完全培养基的孔作为阴性对照。将孔板继续放置在培养箱内孵育24h,随后吸出孔板内的液体,每孔用PBS缓冲液清洗2次,加入100 $\mu$ L CCK-8溶液(使用1640完全培养基稀释,CCK-8体积百分比为10%),同时选取3个未使用的孔,加入CCK-8溶液,以用作空白对照孔。在培养箱内继续孵育4h,使用酶标仪测定孔板内各孔在波长为450nm处的OD值(Optical Density,光密度)。并按照以下公式计算不同材料处理后的细胞活性:

[0064] 细胞活性(%) =  $(OD_x - OD_b) - (OD_n - OD_b)$

[0065] 其中, $OD_x$ 表示任一材料处理孔的OD值, $OD_b$ 表示空白对照孔的OD值, $OD_n$ 表示阴性对照孔的OD值。

[0066] (2)抗原递呈细胞内化实验及激光共聚焦共定位

[0067] 首先,为表征OVA淀粉样蛋白原纤维的细胞内化效果,需使用Cy5-NHS酯标记未经任何处理的卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维。将未经任何处理的卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维用PBS缓冲液稀释并超滤纯化,使其浓度为1mg/mL。随后,将1mL的OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维(浓度均为1mg/mL)分别与1 $\mu$ L Cy5-NHS酯(浓度为1mg/mL)混匀,并在恒温摇床上振荡4h,通过超滤离心管除去多余的游离染料,使用1640完全培养基将各组材料稀释至50 $\mu$ g/mL,即得浓度为50 $\mu$ g/mL的Cy5-NHS酯标记的OVA、Cy5-NHS酯标记的OVA低聚体和Cy5-NHS酯标记的OVA淀粉样蛋白原纤维。

[0068] 将DC 2.4细胞悬液接种于24孔板中(每孔200 $\mu$ L,细胞总数约为 $2 \times 10^5$ 个),随后在细胞培养箱中以37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>条件孵育24h。吸出孔板内的液体,每孔用PBS缓冲液清洗2次,分别加入Cy5-NHS酯标记的OVA、Cy5-NHS酯标记的OVA低聚体和Cy5-NHS酯标记的OVA淀粉样

蛋白原纤维(200 $\mu$ L,浓度为50 $\mu$ g/mL,每组设置4个平行孔,及仅含培养基与细胞的空白对照孔),继续在培养箱中孵育6h。吸出所有液体,使用PBS缓冲液清洗三次,使用胰蛋白酶消化细胞(每孔加入200 $\mu$ L),并用1640完全培养基终止消化(每孔加入400 $\mu$ L)。使用移液枪将所有液体吹打均匀后加入到1.5mL离心管中,以1100rpm转速离心5min,随后除去上清液,使用PBS缓冲液清洗3次,并用PBS缓冲液重悬细胞。最后,使用流式细胞仪检测各组细胞的Cy5平均荧光强度,以空白对照作为基准,获得各组中细胞对于材料的内化百分比。

[0069] 将1mL DC 2.4细胞悬液接种于激光共聚焦皿中(约 $1 \times 10^5$ 个细胞),在细胞培养箱中以37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>条件孵育24h,吸出上清液,用PBS缓冲液清洗皿底3次,分别加入Cy5-NHS酯标记的OVA,Cy5-NHS酯标记的OVA微球和Cy5-NHS酯标记的OVA淀粉样蛋白原纤维(1mL,浓度为10 $\mu$ g/mL),在培养箱中继续孵育。6h后,吸出上清液,用无菌PBS缓冲液清洗3次,加入用1640基础培养基稀释的Lyso-Tracker Green DND-26溶酶体绿色荧光探针(按照体积比为1000:1稀释),孵育1h。1h后,吸出上清液,用PBS缓冲液清洗3次以除去未结合的溶酶体绿色荧光探针染料,加入2mL 4%多聚甲醛细胞固定液固定20min。固定完成后,用低温PBS缓冲液清洗三次,加入用PBS缓冲液稀释的DAPI染料(按照体积比为1:1稀释),室温下染色3-5min。最后,用PBS缓冲液清洗三次,并在皿中加入2mL PBS缓冲液,使用激光共聚焦显微镜观察细胞对于未经任何处理的卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维的内化作用。

[0070] 如图4(a)所示,对于OVA低聚物和OVA淀粉样蛋白原纤维,当其浓度处于0.1~2mg/mL范围时,DC 2.4细胞的细胞活力值(细胞存活率)始终高于90%,并且,DC 2.4细胞的细胞活力值随OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维浓度的提高没有发生显著的变化。上述结果表明,OVA低聚物以及OVA淀粉样蛋白原纤维对于树突状细胞(DCs)没有明显的毒副作用,也说明了OVA淀粉样蛋白原纤维不会由于蛋白质的结构变化及积聚作用而产生细胞毒性。

[0071] 使用激光共聚焦显微镜观察DC 2.4细胞对于OVA淀粉样蛋白原纤维的内化作用。如图4(b)所示,流式细胞术的结果表明,OVA淀粉样蛋白原纤维有效提高了DC 2.4细胞的内化率,并且DC 2.4细胞对于OVA淀粉样蛋白原纤维的内化作用最为显著。

[0072] 图4(c)说明,经OVA低聚物及OVA淀粉样蛋白原纤维处理后,DC 2.4细胞中带有较强Cy5荧光的细胞占比提高。

[0073] 图4(d)为经各组材料(OVA、OVA低聚物和OVA淀粉样蛋白原纤维)处理后DC 2.4细胞的激光共聚焦共定位成像,进一步说明OVA淀粉样蛋白原纤维能被细胞内吞而进入胞内进行抗原的加工递呈。

[0074] 实施例3:骨髓来源树突状细胞(BMDCs)的提取及体外激活实验

[0075] 我们实施了体外骨髓来源树突状细胞(BMDCs细胞,购于ATCC)的培养和刺激激活实验,来验证OVA淀粉样蛋白原纤维对于树突状细胞的激活效应。具体操作如下:

[0076] 为了验证未经任何处理的卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体和OVA淀粉样蛋白原纤维对于树突状细胞的激活效应,我们实施了体外骨髓来源树突状细胞(BMDCs)的培养和刺激激活实验。首先,对6-8周龄的C57BL/6雌性小鼠实施安乐死,并进行解剖,提取其双侧后腿腓骨和胫骨内的骨髓,通过裂解红细胞,过滤等步骤,获取骨髓细胞。使用含有粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,20ng/mL)及白介素-4(IL-4,10ng/mL)的RPMI-1640完全培养基混匀细胞,其中每只小鼠所提取的骨髓细胞约使用25mL含有粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子



(GM-CSF, 20ng/mL) 及白介素-4 (IL-4, 10ng/mL) 的RPMI-1640完全培养基混匀, 得到细胞悬液。将细胞悬液接种在6孔板内, 每孔加入4mL上述细胞悬液, 并将孔板在细胞培养箱中 (37℃, 5%CO<sub>2</sub>) 孵育。培养过程中, 每间隔两天需更换新的培养基。

[0077] 当细胞生长至第6天时, 可进行体外刺激激活实验。首先, 使用移液枪将孔板内的所有细胞吹匀, 吸出后加入到15mL离心管中, 在1500rpm的转速下离心5min。除去上清液后, 在管中加入1mL RPMI 1640完全培养基 (不含GM-CSF及IL-4) 重悬细胞; 使用血球计数板对细胞进行计数后, 使用1640完全培养基将细胞的密度调整至约为 $1 \times 10^6$ 个/mL, 即为稀释后的细胞悬液。在24孔板中, 每孔加入500 $\mu$ L稀释后的细胞悬液, 同时分别加入10 $\mu$ g卵清蛋白 (OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维, 和含有10 $\mu$ g OVA的脂多糖/OVA (即脂多糖与OVA的混合物 (LPS/OVA); LPS/OVA中, OVA的加入量为10 $\mu$ g, LPS的加入量为1 $\mu$ g), 其中, OVA为阴性对照, OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维为材料组, 脂多糖/OVA (LPS/OVA) 作为阳性对照。将孔板在细胞培养箱中继续孵育24h, 随后吹打细胞并将其收集至1.5mL EP管中, 以1500rpm、4℃条件离心5min, 弃去上清, 使用PBS缓冲液清洗两次。在避光条件下, 将PerCP-Cy5.5-anti-CD86抗体、FITC-anti-CD80抗体 (抗体均购于eBioscience公司) 混合后用PBS缓冲液稀释, 得到混合液, 使每100 $\mu$ L混合液中PerCP-Cy5.5-anti-CD86抗体、FITC-anti-CD80抗体的含量均为0.5 $\mu$ L。取100 $\mu$ L混合液与 $0.5 \times 10^6$ 个BMDCs共混以进行抗原-抗体结合标记。在室温下孵育30min后, 以1000rpm、4℃条件离心5min, 去除上清液中未结合的抗体染料, 并用PBS缓冲液重悬细胞, 在流式细胞仪上通过各抗体分子所对应的荧光通道对细胞进行分析, 从而分析对应的细胞表面共刺激分子的表达, 从而得出各组材料处理后被刺激激活的BMDCs的百分比, 并用Flowjo X软件分析数据。

[0078] 如图5所示, 在受到OVA低聚物以及OVA淀粉样蛋白原纤维的刺激后, BMDCs细胞表面MHC II分子及CD80分子的表达均显著高于OVA刺激的BMDCs细胞, 而CD86分子的表达率仅在OVA淀粉样蛋白原纤维的刺激下显著提高。该结果表明, OVA低聚物以及OVA淀粉样蛋白原纤维对于BMDCs细胞的成熟均起到了有效促进作用, 其中OVA淀粉样蛋白原纤维的促进作用最为显著。

[0079] 实施例4: 免疫组化分析

[0080] 我们通过免疫组化实验, 用倒置荧光显微镜观察皮下接种卵清蛋白 (OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后, 脾脏内抗原的富集程度。具体操作如下: 通过免疫组化分析检测皮下注射后卵清蛋白 (OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA在脾脏中的富集量, 使用C57BL/6雌性小鼠 (6-8周龄, 购于广东省医学实验动物中心; 下同) 作为实验对象。首先, 将小鼠进行随机分组 (n=4), 分别为OVA注射组, OVA低聚体组, OVA淀粉样蛋白原纤维组和铝佐剂/OVA (铝佐剂购于Sigma-Aldrich) 组, 随后在小鼠的腿部内侧皮下注射100 $\mu$ L上述材料 (卵清蛋白 (OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA, 单侧50 $\mu$ L, 浓度均为300 $\mu$ g/mL, 使用PBS缓冲液稀释, 其中铝佐剂/OVA组以铝佐剂代替PBS缓冲液)。在皮下免疫后的第2天和第7天, 在每组中随机选取2只小鼠实施安乐死, 并提取脾脏, 用4%多聚甲醛固定后制成厚度约为2mm的切片。将anti-OVA单抗 (anti-OVA单抗购于biolegend, anti-OVA单抗与PBS缓冲液按体积比1:200稀释) 与切片在37℃下共同孵育1h, 并将HRP标记的goat-anti-rabbit-IgG抗体 (购于biolegend, HRP标记的goat-anti-rabbit-IgG抗体与PBS缓冲液按体积比1:200稀释) 与切片再孵育。最后, 将切片浸没在苏木

精溶液中从而对细胞核进行染色。染色后的切片可用倒置荧光显微镜观察,以检测各组材料(卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA)中的OVA抗原肽在脾脏中的富集量。

[0081] 如图6(a)所示,在接种OVA淀粉样蛋白原纤维2天后,脾脏内的抗原富集程度更高(黄色区域表示抗原)。并且,在单次皮下接种OVA淀粉样蛋白原纤维7天后,脾脏内的抗原富集程度仍然显著高于OVA注射组及OVA低聚物组(见图6(b)-(c))。相反,接种OVA低聚物后,脾脏内抗原富集程度与接种OVA没有显著性差异。结果表明,接种OVA淀粉样蛋白原纤维能够有效提高抗原在脾脏内的富集程度。

[0082] 实施例5:脾细胞增殖水平

[0083] 脾细胞增殖实验是评价疫苗在机体内引发的免疫效应的重要指标。

[0084] 对实施例4皮下免疫后第7天的C57BL/6小鼠实施安乐死并收集脾细胞后,使用RPMI1640完全培养基收集部分脾细胞,并将各组(卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA)对应的脾细胞悬液加入到96孔板中(每孔中加入100 $\mu$ L脾细胞悬液,脾细胞总数约为 $2 \times 10^5$ 个),分别向孔中加入100 $\mu$ L抗原OVA(50 $\mu$ g/mL,RPMI 1640完全培养基稀释),同时以不加抗原OVA的孔为对照孔,以仅含1640完全培养基而不加脾细胞悬液的孔作为空白对照孔,将孔板在细胞培养箱中(37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>)孵育72h。随后,在每孔中加入20 $\mu$ L CCK-8检测液,继续在培养箱中孵育4h,通过多功能酶标仪检测各孔在450nm处的OD值,并通过以下公式计算代表脾细胞增殖水平的增殖指数(PI):

$$[0085] \quad PI(\%) = (OD_p - OD_b) / (OD_n - OD_b) \times 100\%$$

[0086] 其中,OD<sub>p</sub>代表各组中加入抗原OVA的孔的OD值,OD<sub>n</sub>代表各组中不含抗原OVA的孔的OD值,OD<sub>b</sub>代表仅含培养基,而不含细胞的空白对照孔的OD值。

[0087] 如图7所示,与OVA免疫的小鼠相比,取自OVA淀粉样蛋白原纤维组和OVA低聚物组免疫小鼠体内的脾细胞在受到抗原OVA再次刺激后,产生了更为强烈的脾细胞增殖效应,其中OVA淀粉样蛋白原纤维组小鼠的脾增殖指数最高。该结果初步表明,使用OVA淀粉样蛋白原纤维组和OVA低聚物组免疫小鼠能够在一定程度上引发更为强烈的免疫应答及免疫记忆效应,并且OVA淀粉样蛋白原纤维的效果最为明显。

[0088] 实施例6:体内树突状细胞活化

[0089] 使用C57BL/6雌性小鼠(6-8周龄,购于广东省医学实验动物中心)作为实验对象,通过一系列体内实验分析卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA的免疫原性。使用C57BL/6雌性小鼠(6-8周龄)作为实验对象。首先,将小鼠进行随机分组(n=5),分别为OVA注射组,OVA低聚体组,OVA淀粉样蛋白原纤维组和铝佐剂/OVA组,随后在小鼠的腿部内侧皮下注射100 $\mu$ L材料(卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA),间隔7天后再次注射,共实施3次皮下注射。在第3次注射完成后的第7天,对所有小鼠实施安乐死,收集其脾脏。对脾脏进行研磨,过滤,红细胞裂解清除等一系列操作后,使用PBS缓冲液清洗脾细胞,并离心去除上清液。在避光条件下,将APC-anti-CD11c抗体、PE-anti-MHC II抗体、PerCP-Cy5.5-anti-CD40抗体(抗体均购于eBioscience公司)混合后用PBS缓冲液稀释,得到混合液,使每100 $\mu$ L混合液中APC-anti-CD11c抗体、PE-anti-MHC II抗体、PerCP-Cy5.5-anti-CD40抗体的含量均为0.5 $\mu$ L。取100 $\mu$ L混合液与 $1 \times 10^6$ 个脾细胞共混以进行抗原-抗体结合标记。30min后,以1000rpm、4 $^{\circ}$ C条件离心5min,去除上清液中未结合

的抗体染料,并用PBS缓冲液重悬细胞,在流式细胞仪上通过各抗体分子所对应的荧光通道对细胞进行分析,从而得出各组中树突状细胞表面共刺激分子的表达量,并用Flowjo X软件分析数据。

[0090] 由图8分析可知,相比OVA,OVA淀粉样蛋白原纤维经皮下注射后能够有效地促进体内树突状细胞(DCs)成熟,上调DCs表面II型主要组织相容性复合体(MHC II)以及协同刺激分子CD40的表达。

[0091] 实施例7:记忆T细胞活化

[0092] 通过流式细胞术对实施例6免疫接种的小鼠脾细胞进行了检测,分析了效应记忆性T细胞(CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>low</sup>) 在CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞中的占比。在对小鼠进行第3次皮下注射后的第7天,收集各组小鼠的脾细胞,并进行上述抗体标记前的相同操作。在避光条件下,将PerCP-Cy5.5-anti-CD8 $\alpha$ 抗体、FITC-450-anti-CD4抗体、PE-anti-CD44抗体和APC-anti-CD62L抗体(抗体均购于eBioscience公司)混合后用PBS缓冲液稀释,得到混合液,使每100 $\mu$ L混合液中PerCP-Cy5.5-anti-CD8 $\alpha$ 抗体、FITC-450-anti-CD4抗体、PE-anti-CD44抗体和APC-anti-CD62L抗体的含量均为0.5 $\mu$ L。取100 $\mu$ L混合液与 $1 \times 10^6$ 个脾细胞共混以进行抗原-抗体结合标记。30min后,以1000rpm 4 $^{\circ}$ C条件离心5min,去除上清液中未结合的抗体染料,并用PBS缓冲液重悬细胞,在流式细胞仪上通过各抗体分子所对应的荧光通道对细胞进行分析,从而分析各组小鼠脾细胞中效应记忆CD4<sup>+</sup>T细胞和效应记忆CD8<sup>+</sup>T细胞的百分比,以评估不同材料对小鼠所造成的体内免疫记忆效应的强弱。

[0093] 如图9所示,在接种了OVA淀粉样蛋白原纤维后,CD4<sup>+</sup>效应记忆性T细胞和CD8<sup>+</sup>效应记忆性T细胞的占T细胞的百分比均显著高于OVA与OVA低聚物组,甚至高于铝佐剂/OVA组,而OVA低聚物与OVA组的情况无显著性差异。上述结果表明,OVA淀粉样蛋白原纤维能够在体内引发更为强烈的免疫记忆效应,同时支持了脾增殖实验的结果。

[0094] 实施例8:OVA特异性抗体滴度

[0095] 使用酶联免疫吸附(ELISA)间接法测定小鼠血清中OVA特异性免疫球蛋白IgG的抗体滴度。具体操作如下:在对实施例6的小鼠进行第3次皮下注射卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后的第7天,收集各组(卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA)小鼠的血清,并使用酶联免疫吸附(ELISA)间接法测定小鼠血清中OVA特异性免疫球蛋白IgG的抗体滴度。本部分实验按照ELISA试剂盒(购于biolegend公司)说明书进行,具体方法如下:使用浓度为0.05M,pH值为9.6的碳酸盐缓冲液(CBS)溶解抗原OVA,制备浓度为10 $\mu$ g/mL的抗原包被液。将抗原包被液加入到96孔板中(100 $\mu$ L/孔),4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。使用PBST(PBS缓冲液+0.05%吐温-20)清洗孔板3次(注意本实验中每次清洗后均需除去残余液体),再向孔板中以200 $\mu$ L/孔的体积加入封闭液(PBST+2%牛血清白蛋白),在微孔板孵育器中以37 $^{\circ}$ C,400rpm的条件孵育1h。随后,用PBST清洗孔板3次,向每孔中加入100 $\mu$ L按照梯度稀释的各组小鼠的血清(使用PBST+1%牛血清白蛋白作为血清稀释液,每个稀释倍数设置3个平行对照孔),继续孵育1.5h。用PBST洗板3次,然后在每孔中加入100 $\mu$ L辣根过氧化物酶缀合的山羊抗体抗-小鼠标记的抗小鼠IgG(按照1:2000体积比并使用血清稀释液稀释),再次孵育1h。孵育完成后,用PBST洗板4次,并在避光条件下,向每孔中加入100 $\mu$ L的TMB底物进行显色。15min后,向每孔中加入100 $\mu$ L稀硫酸(1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)以终止显色反应。最后,使用多功能酶标仪测量各孔在450nm处的OD值,从而评估各组小鼠血清

在不同稀释倍数下的显色强度。此处,对数据进行处理及非线性拟合,以OD值为1的稀释倍数作为每只小鼠对应的抗体滴度。

[0096] 如图10所示,与OVA and OVA低聚物组相比,接种了OVA淀粉样蛋白原纤维的小鼠血清中OVA特异性免疫球蛋白IgG的抗体滴度更高。抗体滴度是衡量某种抗体识别抗原所需的最大稀释度,其数值与样品中的抗体含量正相关。结果表明,OVA淀粉样蛋白原纤维能够引发更高的IgG抗体表达水平,在体内引发更强烈的体液免疫应答。

[0097] 实施例9:细胞因子分泌水平

[0098] 收集免疫接种后的小鼠的脾细胞,通过使用抗原对其再次刺激,引发免疫记忆效应,同时收集脾细胞悬液,通过ELISA法检测了悬液中细胞因子的表达水平。具体操作如下:在对实施例6小鼠分别进行第3次皮下注射卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后的第7天,实施安乐死并使用RPMI 1640完全培养基收集脾细胞,将细胞以 $2 \times 10^6$ 个/mL的密度加入到12孔板中,并在各孔中加入2mL OVA溶液(50 $\mu$ g/mL)以刺激细胞分泌细胞因子,将孔板在细胞培养箱中(37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>) 孵育60h。收集各小鼠的细胞至离心管中,以1500rpm的转速离心5min,收集上清液。随后,使用ELISA双抗体夹心法检测细胞因子IL-4、IL-10、TNF- $\alpha$ 的分泌水平。具体方法如下:在ELISA试剂盒(购于biolegend公司)专用96孔板中,按照100 $\mu$ L/孔的体积加入抗体包被液溶液(使用试剂盒中专用的包被液及抗体原液制成),在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。用PBST清洗孔板4次(本实验中每次清洗后均需除去残余液体),在每孔中加入200 $\mu$ L加入专用的稀释液Assay Diluent A溶液,在微孔板震荡孵育器中(25 $^{\circ}$ C, 500rpm) 孵育1h。用PBST洗板4次,在每孔中加入100 $\mu$ L浓度已知的细胞因子标准品及收集的脾细胞上清液,孵育2h。用PBST洗板4次,在每孔中加入100 $\mu$ L Avidin-HRP溶液,孵育1h。用PBST洗板4次,在每孔中加入100 $\mu$ L TMB显色液,15min后向每孔中加入100 $\mu$ L稀硫酸(1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 终止显色反应。最后,使用多功能酶标仪测量各孔在450nm处的OD值,从而评估标准样品及各组小鼠脾细胞上清液的显色强度。其中,浓度已知的标准样品用于拟合样品标准曲线,从而分析各组小鼠脾细胞上清液中细胞因子的表达水平。

[0099] 由图11可知,接种了OVA淀粉样蛋白原纤维后,小鼠脾细胞悬液中IL-4及IL-10的分泌水平均显著高于OVA组以及OVA低聚物组。IL-4与IL-10是Th2型细胞因子,主要由Th2细胞分泌,能够促进Th2细胞增殖,进一步辅助B细胞活化以完成体液免疫应答。IL-4与IL-10分泌量的提高,证明OVA淀粉样蛋白原纤维能够有效促进Th2型细胞因子的表达。

[0100] 实施例10:酶联免疫斑点法检测Th2型细胞因子IL-4的分泌水平

[0101] 通过更为直观的酶联免疫斑点(ELISpot)法检测了典型的Th2型细胞因子IL-4的分泌水平,分析卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA在体内引起的体液免疫效果。具体操作如下:在对实施例6的小鼠分别进行第3次皮下注射卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后的第7天,实施安乐死并收集脾细胞,使用酶联免疫斑点试验(ELISpot)检测其中分泌细胞因子IL-4细胞的数量。本部分实验按照ELISpot试剂盒(购于biolegend公司)说明书进行,具体方法如下:准备全新的IL-4专用ELISpot 96孔板,开封后使用无菌PBS缓冲液清洗孔板4次,向每孔中加入200 $\mu$ L含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基(无需加入青/链霉素,胎牛血清需提前在60 $^{\circ}$ C下孵育30min以进行灭活),在室温下孵育30min。除去液体,向每孔中加入100 $\mu$ L从小鼠体内收集的脾细胞(细胞密度约为 $2 \times 10^6$ 个/mL),再向每孔中加入100 $\mu$ L OVA溶液(25 $\mu$ g/mL,溶于RPMI 1640完

全培养基)以刺激细胞分泌IL-4。将孔板在细胞培养箱中(37℃,5%CO<sub>2</sub>)孵育38h,孵育过程中需避免孔板发生震荡。完成孵育后,去除孔板中的液体,使用PBST清洗孔板5次,除去孔板内残留的液体,向每孔中加入100μL生物素标记的小鼠白介素-4抗体(BVD6-24G2-biotin,1μg/mL,使用无菌的PBS缓冲液-0.5%灭活胎牛血清稀释),在微孔板震荡孵育器上孵育2h(25℃,400rpm),除去液体,使用PBST洗板5次。随后,再向每孔中加入100μL链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶(Streptavidin-HRP,使用PBS缓冲液-0.5%灭活胎牛血清并按照1:1000体积比稀释),在相同条件下孵育1h,除去液体,使用PBST洗板5次。最后,向每孔中加入100μL无菌显色液(BCIP/NBT-plus),在5-15min内观察孔板内显色情况。当孔板内出现黑色斑点时,使用超纯水冲洗孔板终止显色反应。将孔板底部的保护膜除去,并使用超纯水冲洗保护膜底部,然后将孔板在室温下自然晾干,使用iSpot Spectrum读板仪对孔板内斑点进行识别和统计,以斑点数/1×10<sup>6</sup>个脾细胞作为表示分泌IL-4的细胞数量的最终结果。

[0102] 如图12所示,与OVA and OVA低聚物相比,OVA淀粉样蛋白原纤维显著提高了小鼠脾细胞中分泌IL-4的细胞数量。结合上述的结果,我们得出结论,OVA淀粉样蛋白原纤维能够通过促进Th2型细胞因子的分泌,有效增强体内的体液免疫应答。

[0103] 实施例11:注射部位驻留及抗原缓释效果

[0104] 为探究卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维在皮下注射部位的驻留时间,使用小动物活体成像实验进行表征。具体操作如下:为探究卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维在皮下注射部位的驻留时间,使用小动物活体成像实验进行表征。首先,需使用Cy5-NHS酯对卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维进行标记。将1mL的OVA、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维(浓度均为1mg/mL)与20μL Cy5-NHS酯(浓度为1mg/mL)混匀,并在恒温摇床上振荡4h,通过超滤离心除去多余的游离染料,使用PBS缓冲液将各组材料稀释至300μg/mL,得到染料标记的材料(卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维)。将雌性C57BL/6小鼠(6-8周龄)随机分组(n=3),在其背部下侧皮下注射100μL各组染料标记的材料(卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维)。在7天内于不同时间点使用PerkinElmer小动物活体成像系统对小鼠进行观察,以监测其注射部位的Cy5荧光强度变化,从而分析注射材料的驻留程度,并通过Living Image软件分析注射部位的平均Cy5荧光强度。为表征注射材料向淋巴结转移的程度,在注射后的第7天,对小鼠实施安乐死,并对去除的腹股沟淋巴结进行荧光成像观察。

[0105] 如图13(a)和图13(b)所示,经皮下注射后,OVA淀粉样蛋白原纤维在注射部位具有更强的驻留能力,这在一定程度上可以解释免疫组化实验中,OVA淀粉样蛋白原纤维组小鼠的脾脏显示出更高的抗原富集程度。

[0106] 此外,在皮下接种144h并完成活体成像观察后,我们对小鼠进行了安乐死并解剖,提取其腹股沟淋巴结进行荧光成像观察。

[0107] 由图13(c)可知,皮下接种OVA淀粉样蛋白原纤维144h后,小鼠腹股沟淋巴结内的抗原含量显著高于其余各组(OVA和OVA低聚物),证明了OVA淀粉样蛋白原纤维更强的皮下驻留能力提高了抗原递呈细胞(APC)对其摄取并递送至淋巴结的效果。

[0108] 实施例12:体内生物安全性评价

[0109] 为探究OVA淀粉样蛋白原纤维是否会在体内引发毒副作用,以OVA作为阴性对照,评价了OVA淀粉样蛋白原纤维对机体主要器官的影响。在对实施例6的小鼠分别进行第3次

皮下注射卵清蛋白 (OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA后的第7天,实施安乐死并收集各器官(心脏,肝脏,脾脏,肺,肾脏),并使用组织固定液进行固定,使用石蜡包埋法和苏木精-伊红(H&E)染色法对各器官进行切片及染色。最后,使用倒置荧光显微镜观察切片,从而评估材料(卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA)在体内的生物安全性。同时以PBS缓冲液为对照。

[0110] 如图14可知,卵清蛋白(OVA)、OVA低聚体、OVA淀粉样蛋白原纤维和铝佐剂/OVA,对机体的主要器官(心脏,肝脏,脾脏,肺,肾脏)无明显的毒副作用,生物安全性良好。

[0111] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

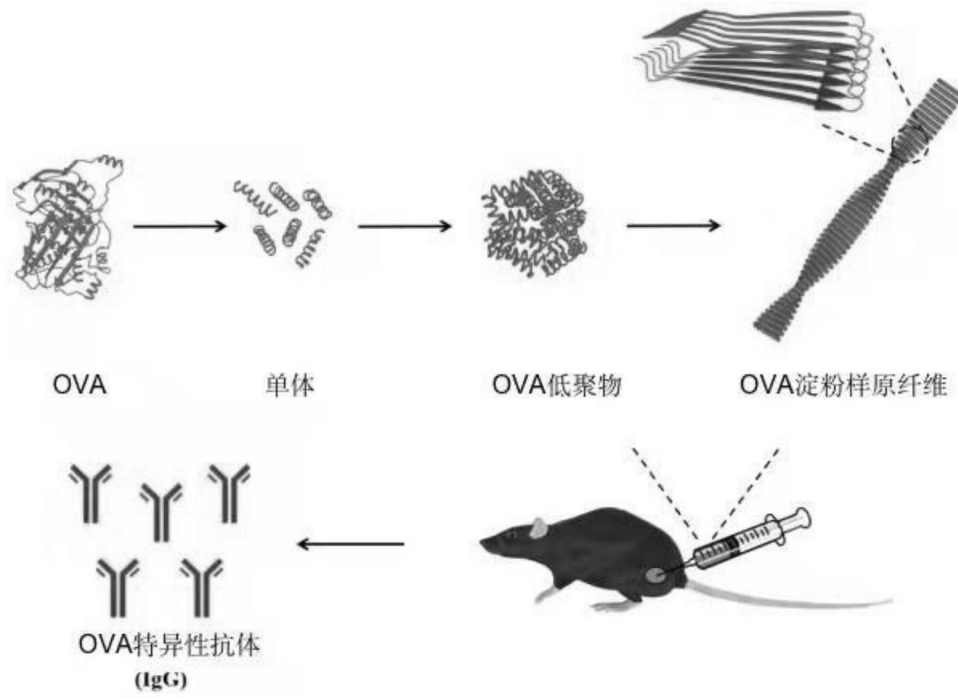


图1

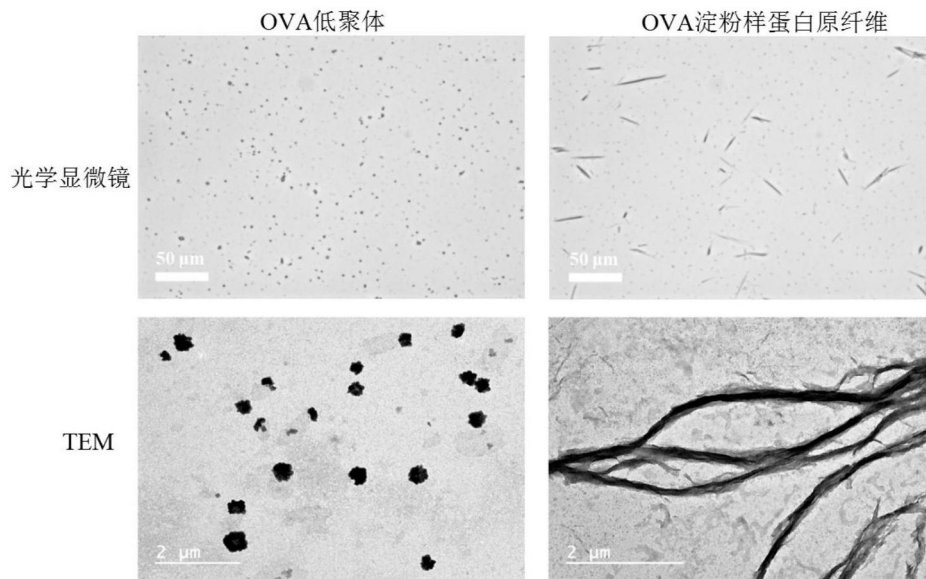


图2

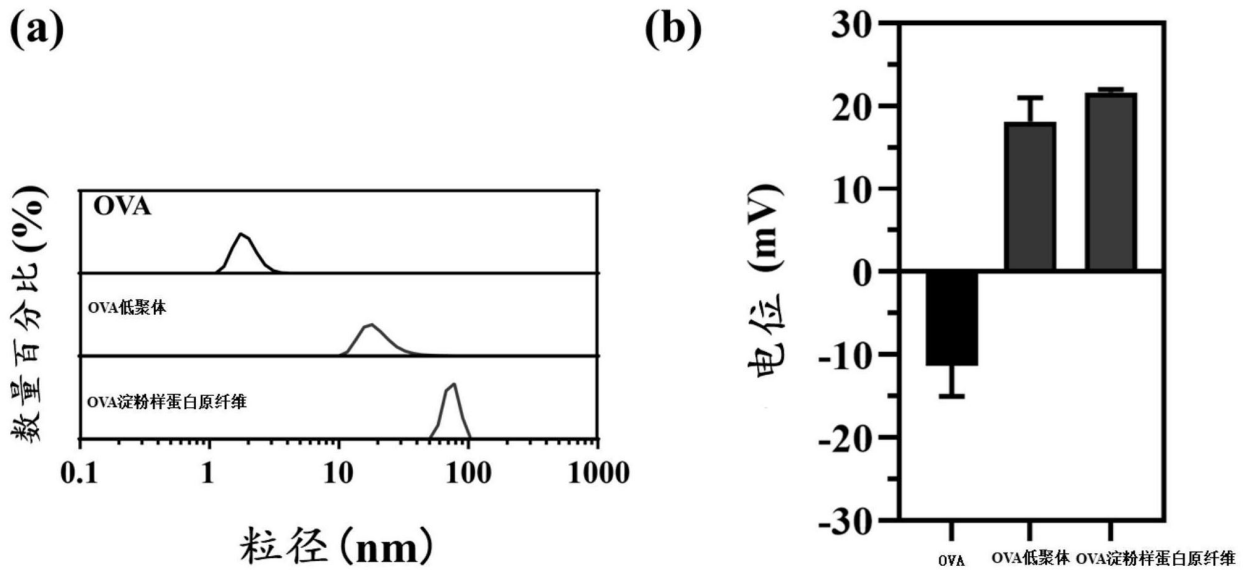


图3



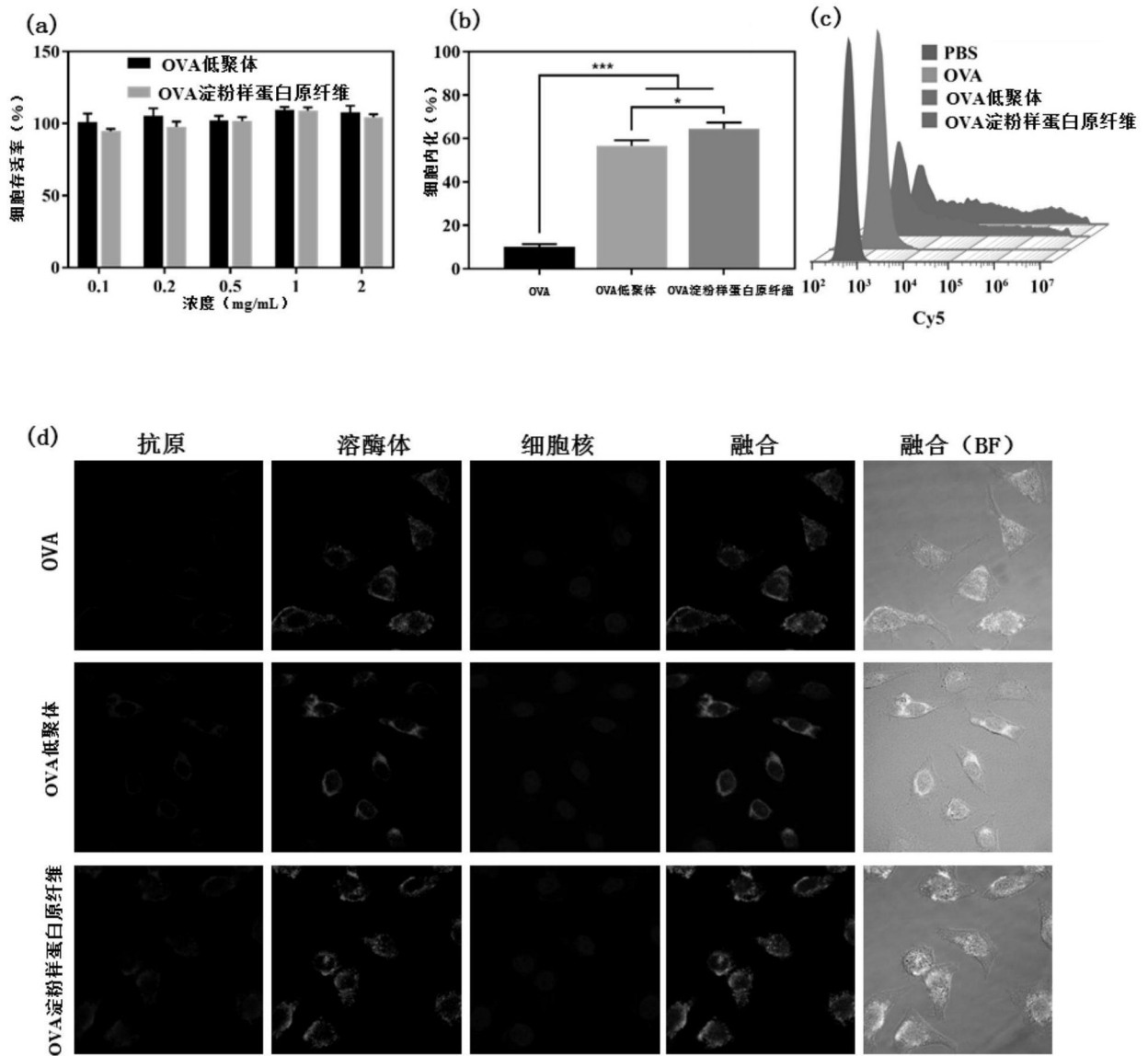


图4

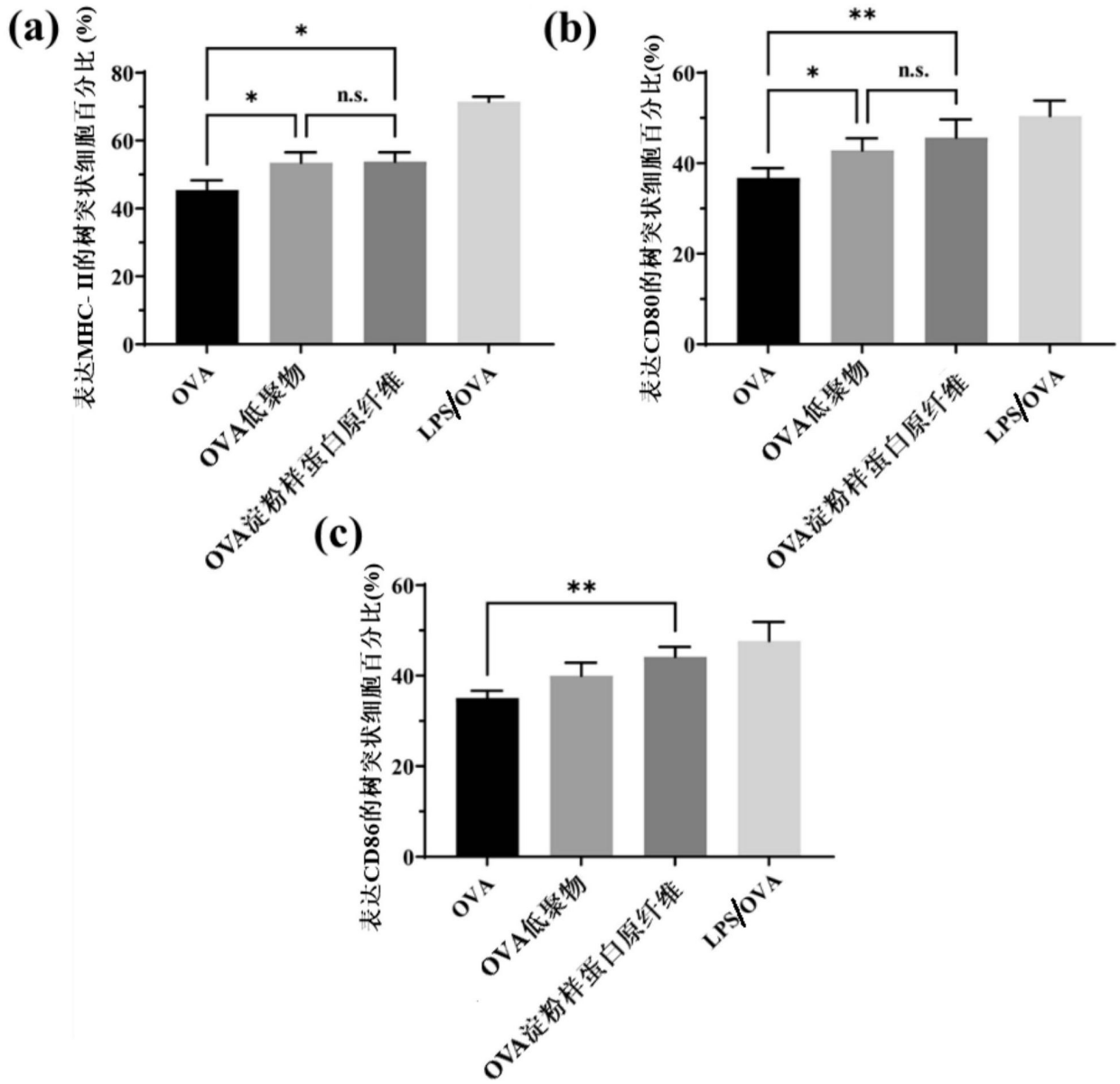


图5

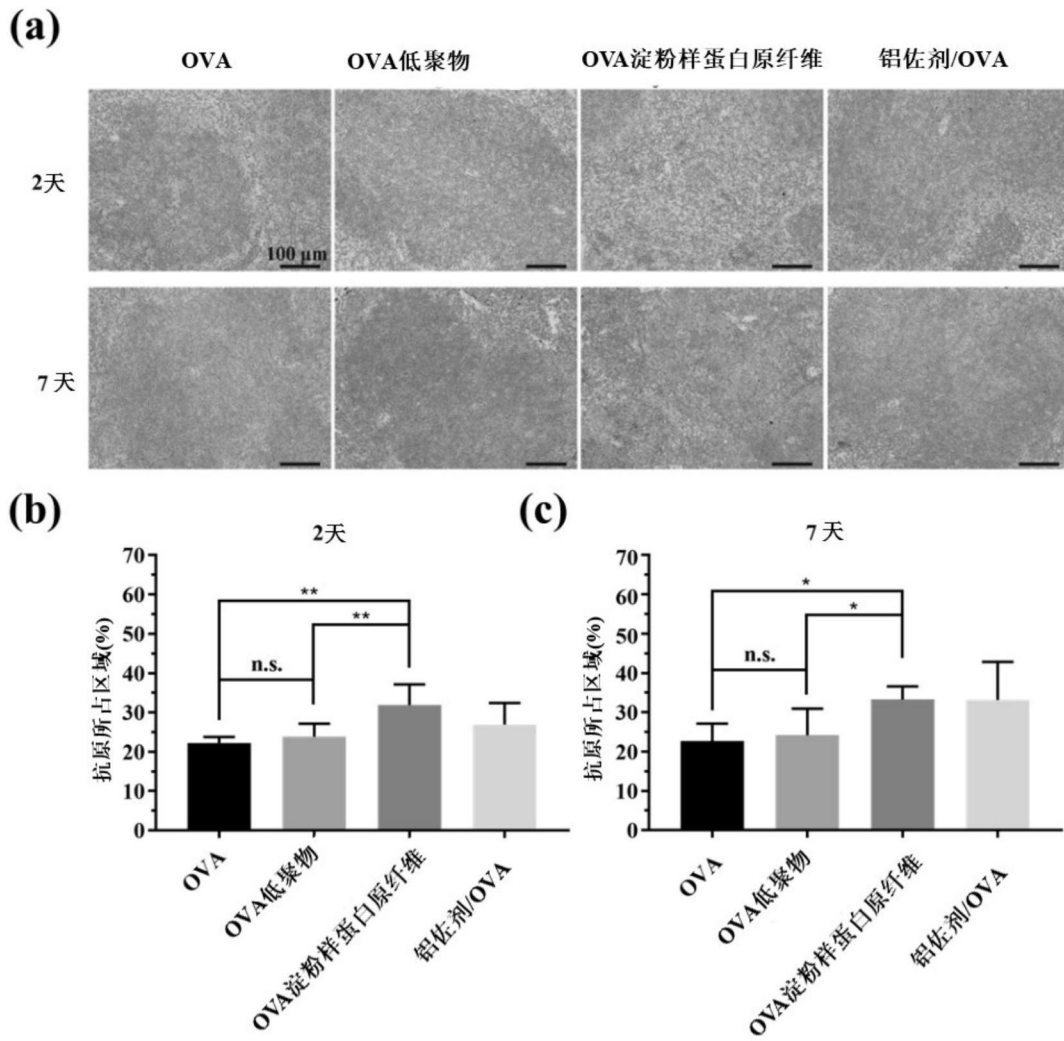


图6

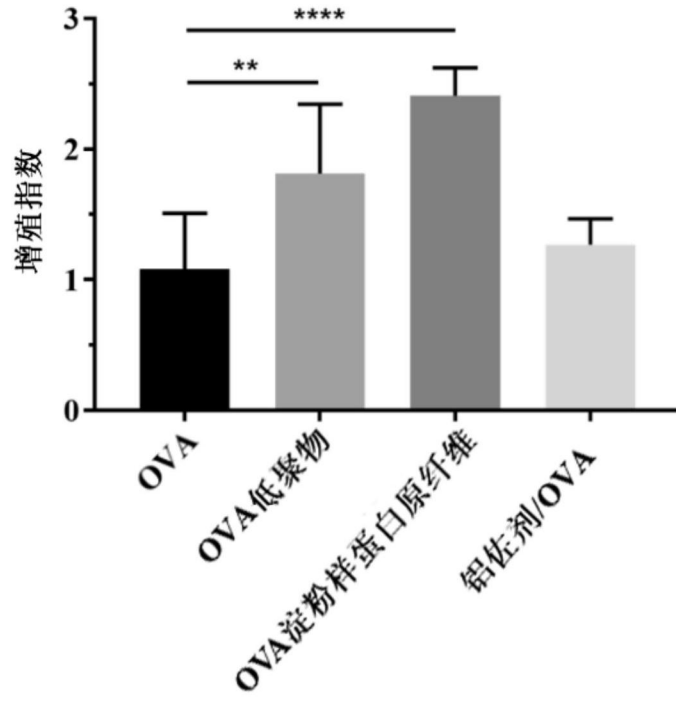


图7

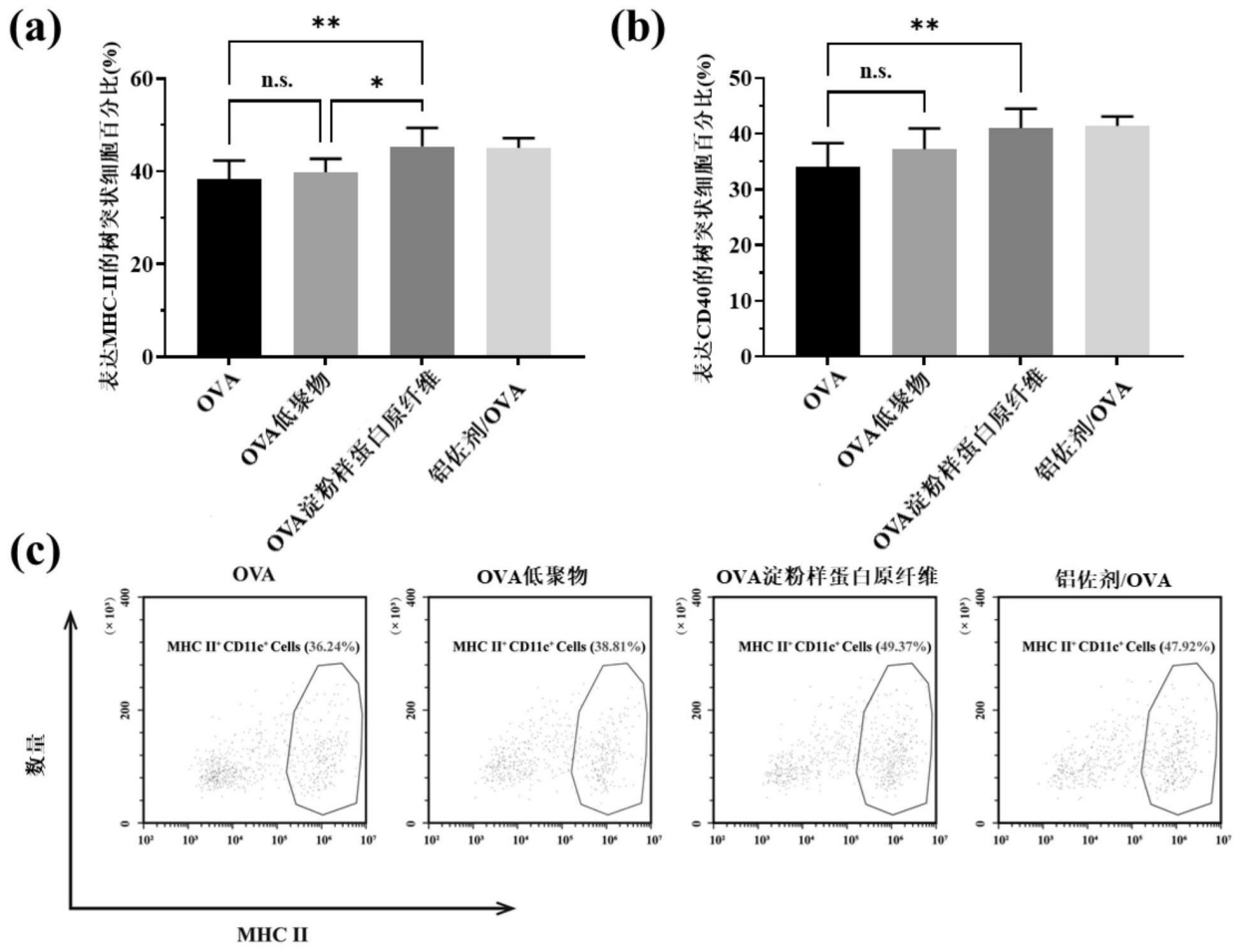


图8

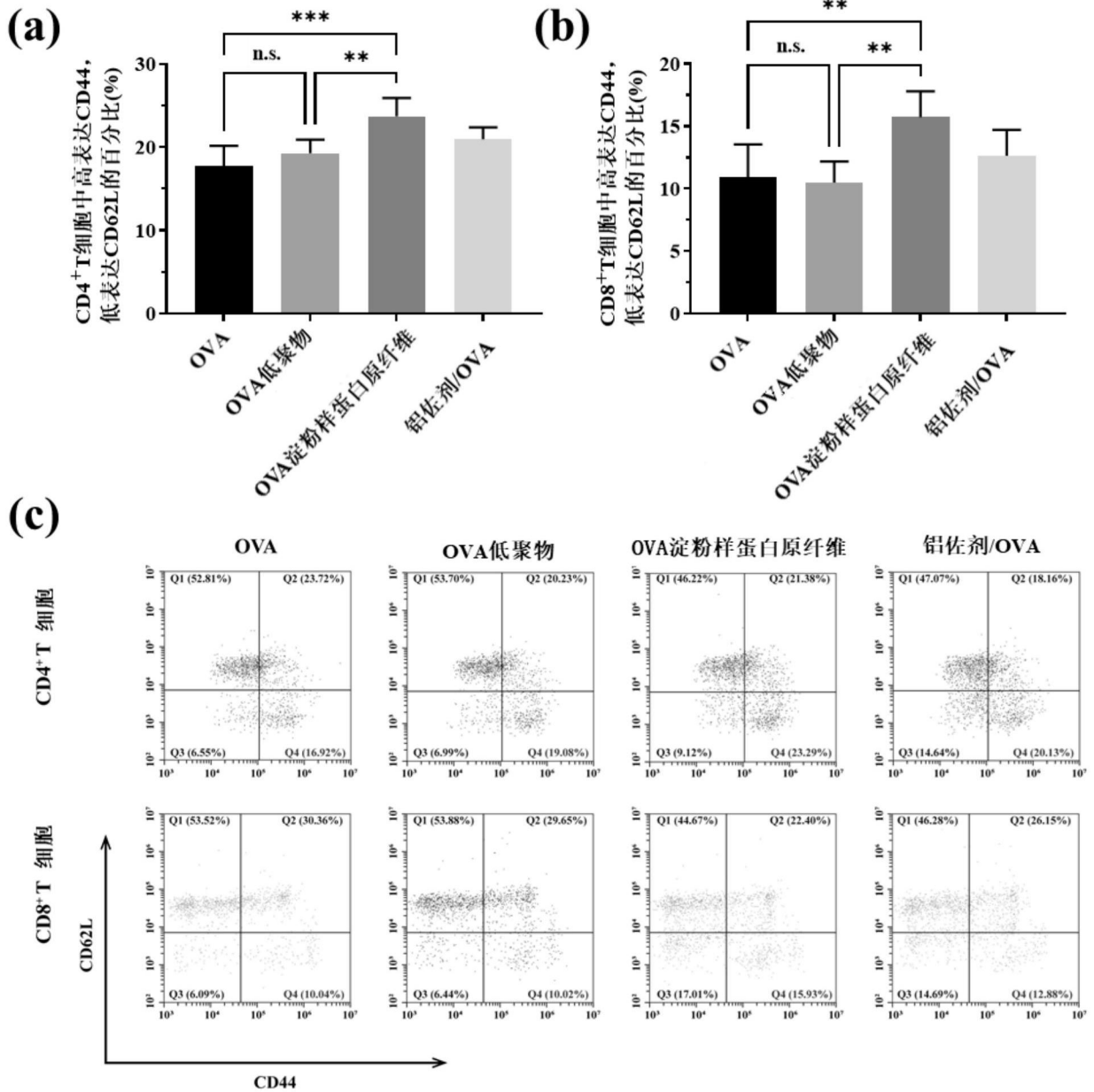


图9

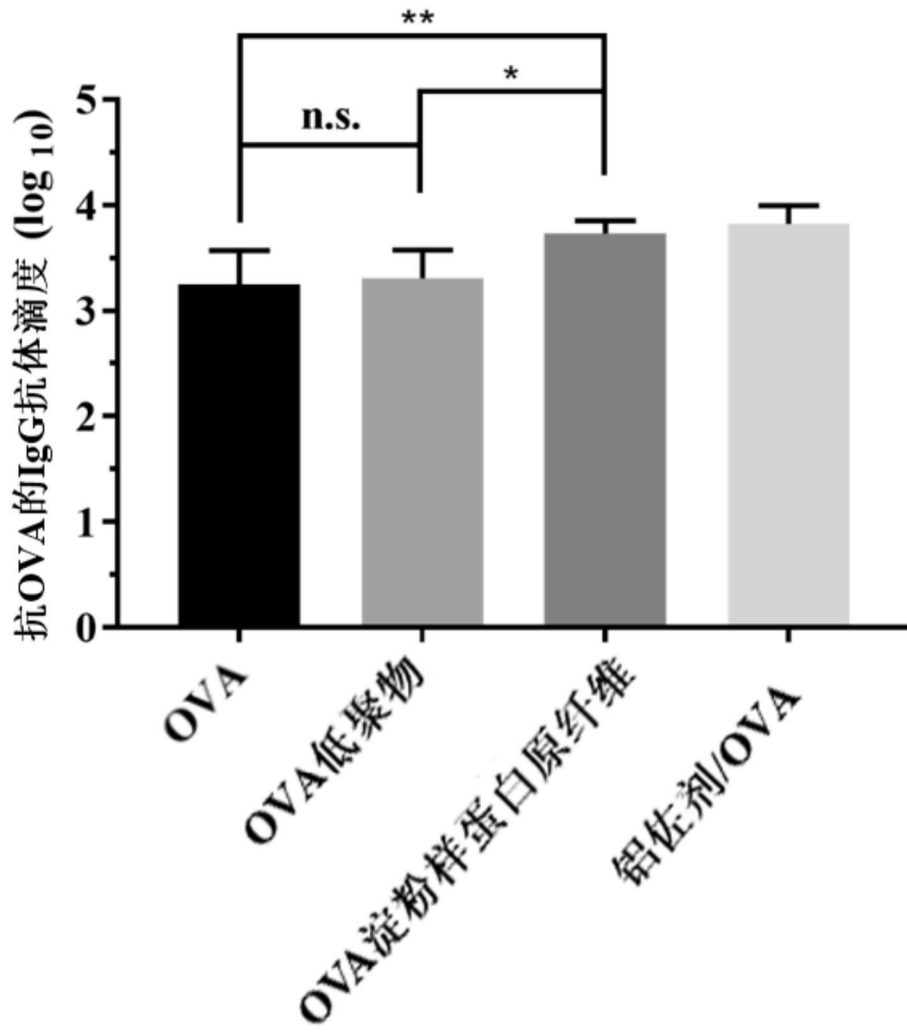


图10

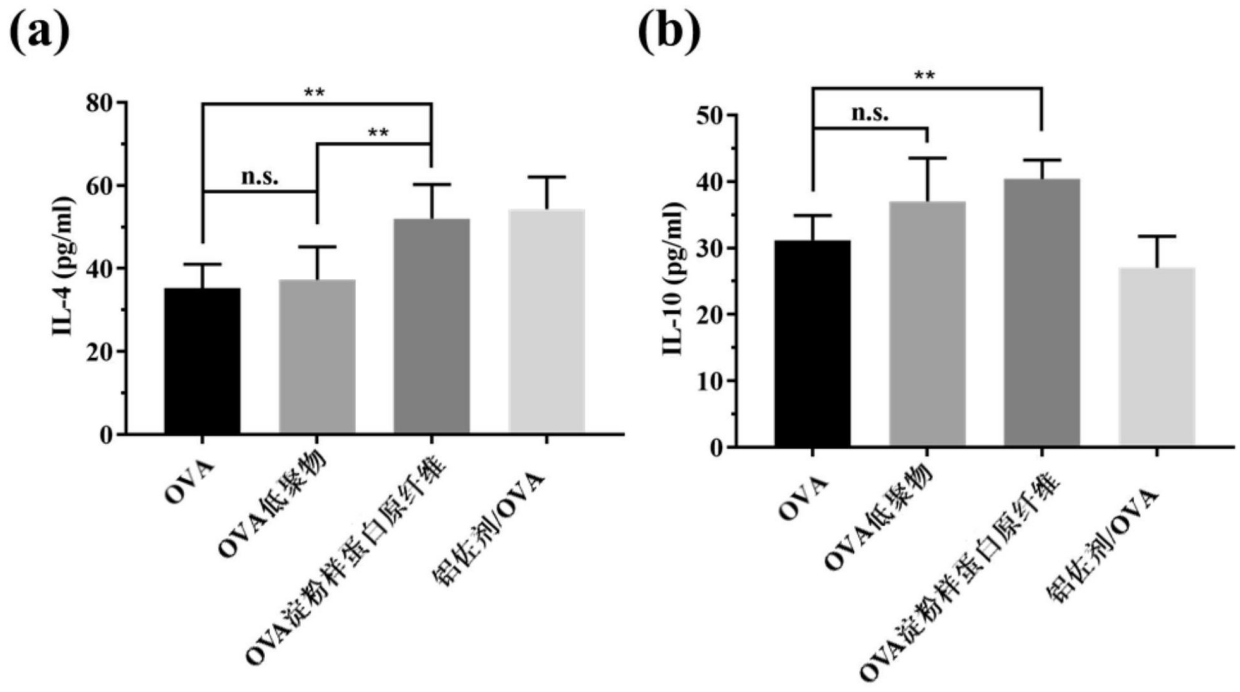


图11



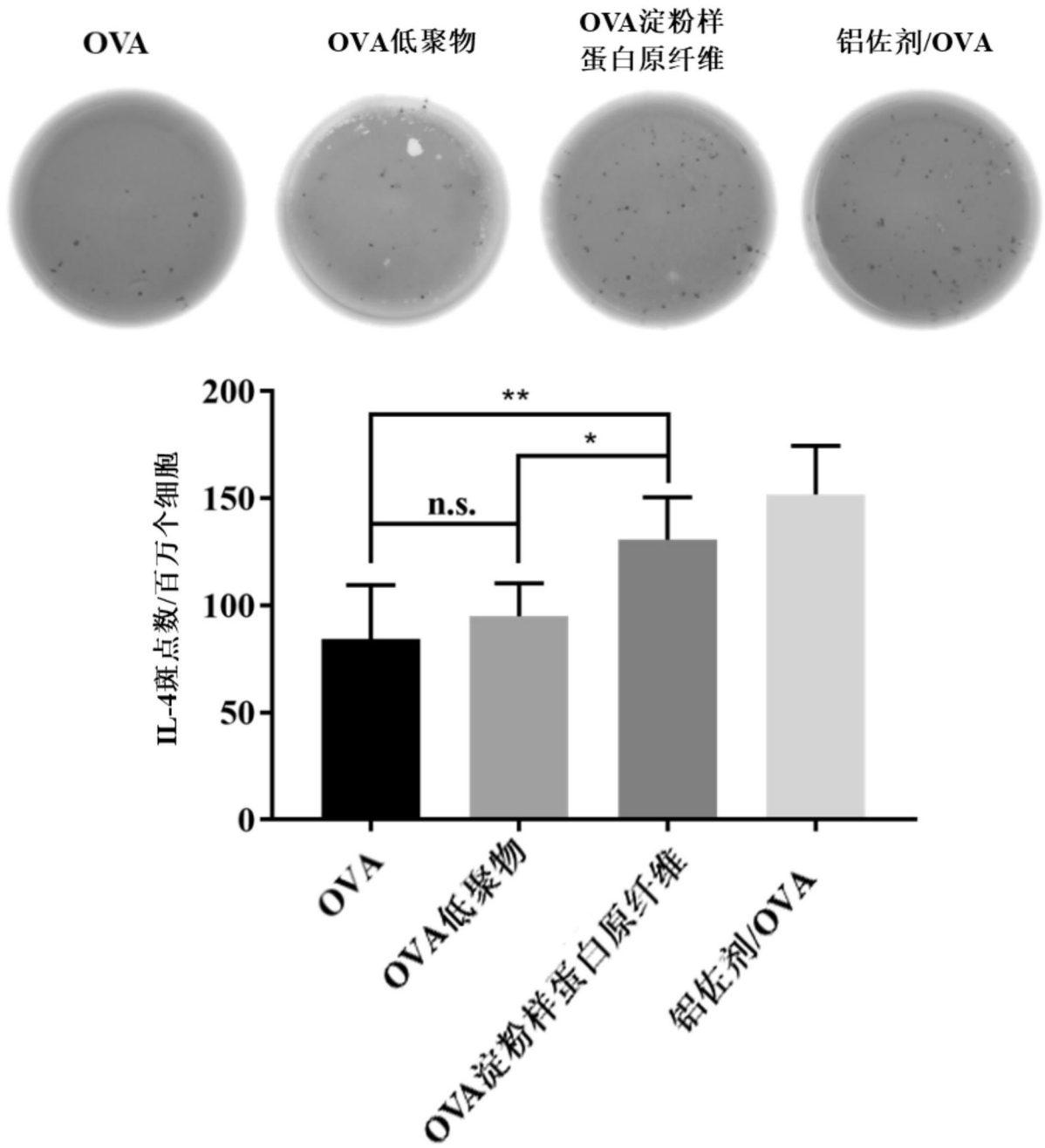


图12

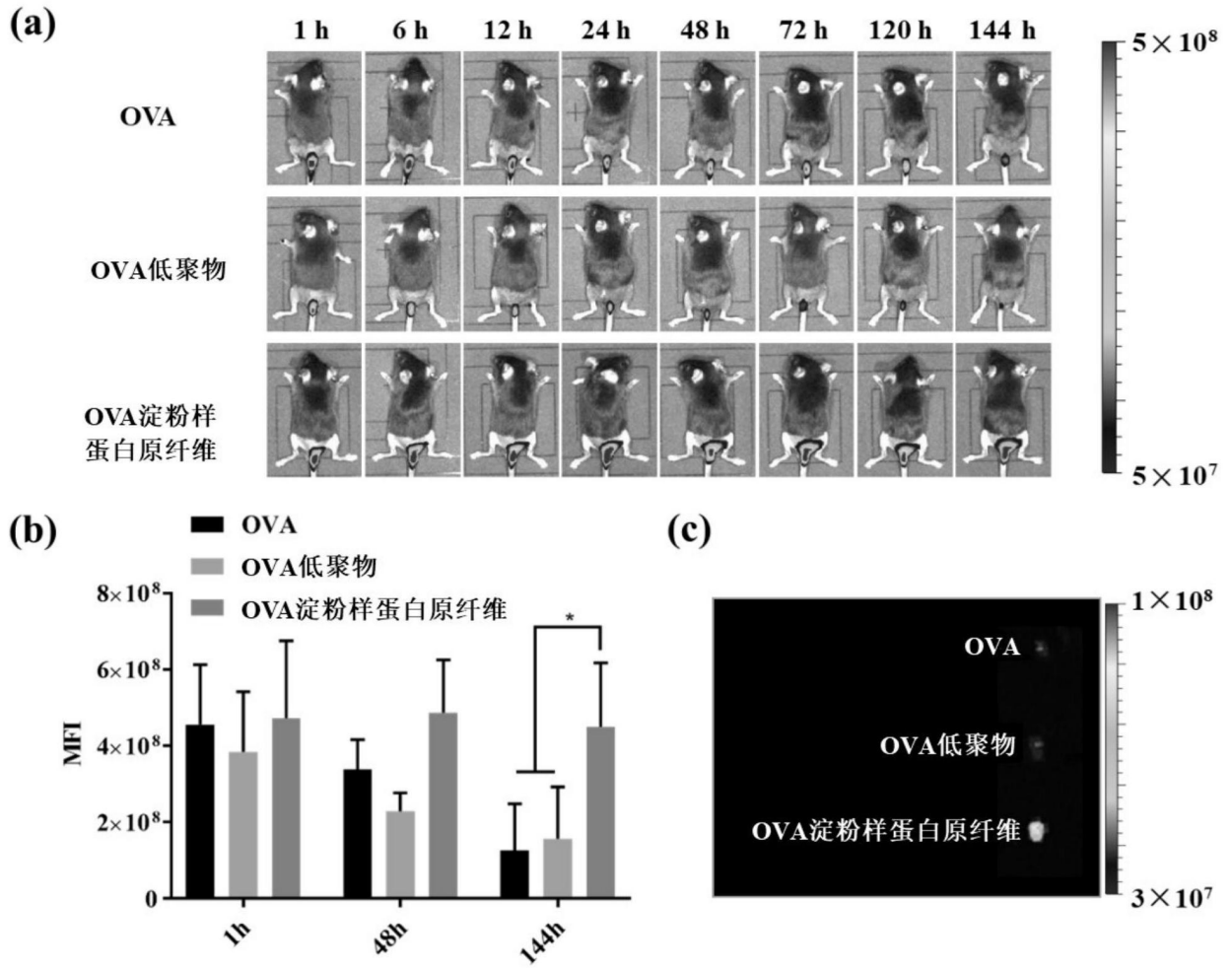


图13

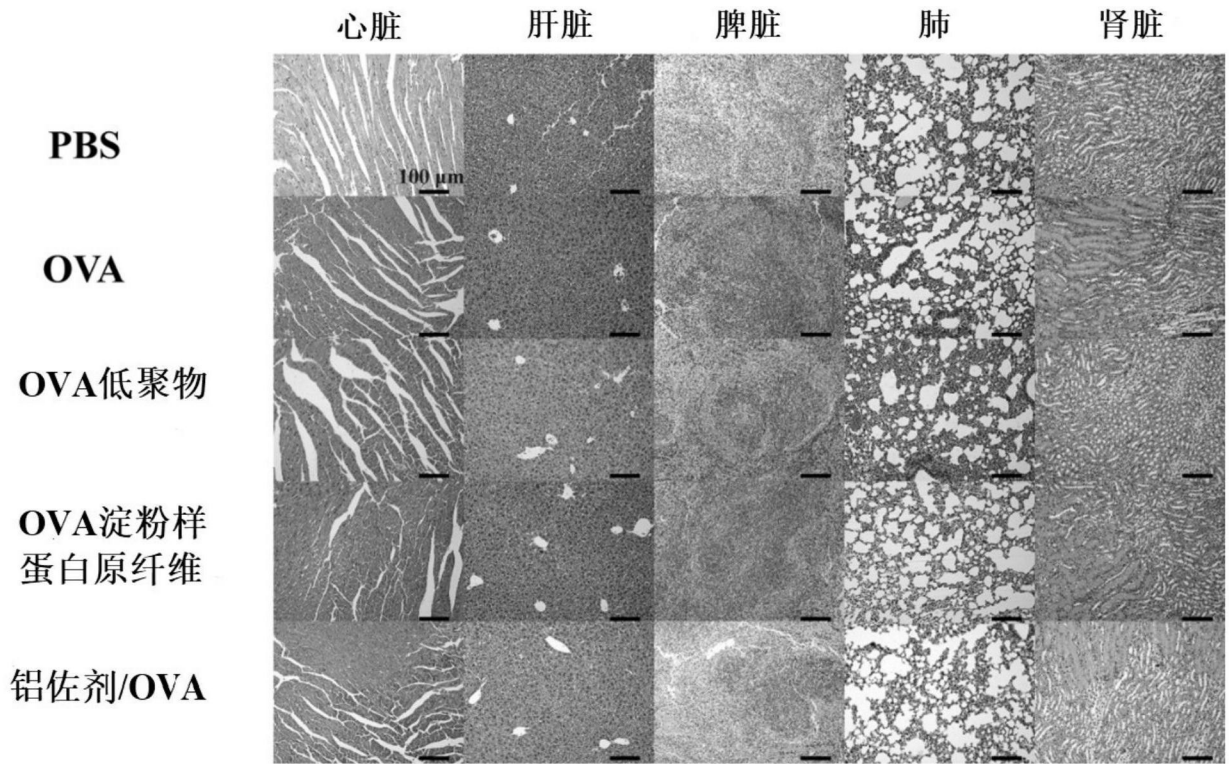


图14