



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108341882 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201810128983.5 *A61K 38/10*(2006.01)

(22)申请日 2018.02.08 *A61K 38/17*(2006.01)

(71)申请人 深圳市前海金卓生物技术有限公司 *A61P 37/04*(2006.01)

地址 518106 广东省深圳市前海深港合作 *A61P 31/04*(2006.01)

区前湾一路1号A栋201室 *A61P 31/14*(2006.01)

申请人 四川大学

(72)发明人 高荣 万小平 魏泓 肖永乐

吴雪颖 朱玉华 胡立博 刘建华

田玉虎 吕学斌 王泽洲 李江凌

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页

序列表2页 附图11页

(54)发明名称

融合猪抗菌肽FPAP重组酵母菌制剂的制备及应用

(57)摘要

本发明公开了融合猪抗菌肽FPAP重组酵母菌制剂的制备及应用。本发明所提供的融合蛋白,包括猪抗菌肽PR-39、猪抗菌肽Tritrpticin、猪抗菌肽PAMP23和猪抗菌肽PG1;所述猪抗菌肽PR-39、猪抗菌肽Tritrpticin、猪抗菌肽PAMP23和猪抗菌肽PG1的氨基酸序列分别为序列1第1-42位、序列1第51-63位、序列1第72-94位和序列1第103-129位。实验证明,本发明的FPAP可以促进淋巴细胞、红细胞和白细胞的增殖,抑制致病微生物的生长,促进非特异性抗体(IgG、IgG1、IgG2a)及疾病特异抗体的分泌,提高动物的免疫能力与存活率。

1. 一种蛋白质,包括猪抗菌肽PR-39、猪抗菌肽Tritrpticin、猪抗菌肽PAMP23和猪抗菌肽PG1;

所述猪抗菌肽PR-39、猪抗菌肽Tritrpticin、猪抗菌肽PAMP23和猪抗菌肽PG1的氨基酸序列分别为序列1第1-42位、序列1第51-63位、序列1第72-94位和序列1第103-129位。

2. 根据权利要求1所述的蛋白质,其特征在于:所述蛋白质为如下a)-e)中任一种蛋白质:

a) 氨基酸序列包括序列表中序列1所示的氨基酸序列的蛋白质;

b) 氨基酸序列由序列表中序列1所示的氨基酸残基组成;

c) 将a)或b)所限定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/或添加且具有提高动物免疫能力功能的蛋白质;

d) 与a)或b)所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同源性且具有提高动物免疫能力功能的蛋白质;

e) a)-d)中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白。

3. 编码权利要求1或2所述蛋白的核酸分子。

4. 根据权利要求3所述的核酸分子,其特征在于:所述核酸分子为如下1)-4)中任一种所示的核酸分子:

1) 其编码序列包括序列表中序列2;

2) 其编码序列为序列表中序列2;

3) 在严格条件下与1)或2)限定的DNA分子杂交且编码权利要求1所述蛋白的DNA分子;

4) 与1)或2)限定的DNA分子具有80%以上或90%以上的同源性且编码权利要求1所述蛋白的DNA分子。

5. 下述1)-4)中的任一种生物材料:

1) 含有权利要求3或4所述核酸分子的表达盒;

2) 含有权利要求3或4所述核酸分子的重组载体;

3) 含有权利要求3或4所述核酸分子的重组菌或转基因细胞系;

4) 所述重组菌的发酵产物。

6. 权利要求1或2所述蛋白质或权利要求3或4所述核酸分子或权利要求5所述的生物材料在下述C1或C2中的应用:

C1、在提高动物免疫能力;

C2、制备提高动物免疫能力产品。

7. 根据权利要求6所述应用,其特征在于:所述提高动物免疫能力为下述M1-M5中的至少一种:

M1、抑制致病微生物的生长;

M2、促进免疫细胞的增加;

M3、促进疫苗诱导的免疫应答;

M4、促进细胞免疫和/或体液免疫;

M5、提高动物发育和生长增重;

和/或,所述致病微生物具体为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、猪肺炎支原体、猪繁殖和呼吸障碍综合症病毒或猪瘟病毒;

和/或,所述免疫细胞具体为淋巴细胞、红细胞或白细胞;

和/或,所述抗体具体为IgG、IgG1和/或IgG2a。

8. 下述X1或X2任一产品:

X1、生物制剂,含有下述X3a、X3b或X3c:

X3a、权利要求1或2所述蛋白质;

X3b、权利要求3或4所述核酸分子;

X3c、权利要求5所述的生物材料;

X2、用于提高动物免疫能力的成套试剂,由上述X1与抗生素组成。

9. 一种提高动物免疫能力的方法,包括对动物施用权利要求1或2所述蛋白质或权利要求3或4所述核酸分子或权利要求5所述的生物材料或权利要求8中所述生物制剂或所述成套试剂,提高所述动物的免疫能力。

10. 根据权利要求6或7所述应用或权利要求9所述的方法,其特征在于:所述动物为H1-H3中的任一种:

H1、哺乳动物;

H2、猪;

H3、小鼠。

融合猪抗菌肽FPAP重组酵母菌制剂的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种融合猪抗菌肽FPAP重组酵母菌制剂的制备及应用。

背景技术

[0002] 现在限制我国养殖业进一步发展和提高经济效益的主要问题是动物疾病的控制、动物产品质量提高和优质廉价饲料的开发生产。我国出口动物产品因检疫和药残质量较低,出口所占比例很低,如猪肉为23万多吨,仅占国际贸易量的4%左右。尤其是四川动物饲料的豆粕等蛋白质原料的90%和玉米等能量饲料原料的70%均依赖外部供给,这就严重制约了我省的畜牧业生产发展和经济效益的提高。因此,如何利用高新生物技术开发高效特色生物饲料,充分利用本地饲料资源,减少饲料中抗生素添加剂的使用,克服动物产品的药残危害,保障绿色有机动物食品的生产,保护人民群众生命健康安全,已成为当代亟需解决的重大科技和社会经济难题。

[0003] 目前中国畜禽养殖业随着集约化程度提高,畜禽养殖规模和养殖密度日益扩大,迫于控制30多种传染性病原感染传播扩散的压力,尤其是禽流感 and 呼吸繁殖综合症等烈性病相继循环爆发,动物养殖中耐药菌引起的腹泻,沙门、大肠杆菌、链球菌、蓝耳病(PRRSV)、圆环病毒(PCV2)、猪瘟(CSFV)等各种细菌、病毒性疾病,长期以来是畜牧养殖中瓶颈限制问题,严重阻碍畜牧业的发展;使抗生素等药物添加剂在饲料的滥用情况非常严重,畜禽疾病和抗生素饲料添加剂的公害问题已经成为制约我国畜禽养殖业发展水平和经济效益提高的瓶颈。饲料抗生素添加剂的滥用不仅提高饲养成本,也导致病原微生物的耐药性和致病力明显增强,严重破坏了动物消化道的微生态平衡,长期使用后在动物体内残留、并富集,畜禽机体因药物毒副作用而削弱健康水平,免疫抗病力显著下降。如此恶性循环,畜禽各种烈性传染疾病频繁发生,难于控制和治疗。而另一方面,药物残留及日益严重的畜禽产品食品安全问题,不仅直接威胁着人类自身的健康,也阻碍了养殖业的发展。

[0004] 动物饲料添加抗生素,长期或不适当使用不仅将诱导病菌出现抗药性,而且在动物产品出现药物残留,造成严重的食品安全隐患,损害人类健康以及招致治疗抗生素的药物失效。欧盟、美国等发达地区2006年开始全面限制抗生素作为饲料添加剂。我国也将严格限制饲料添加抗生素。现代养殖业急需开发取代传统抗生素的无残留、无抗性诱导、安全无污染的新型生物饲料及其添加剂。

[0005] 抗菌肽分子量小,分离纯化和检验存在一定的困难。目前科研中抗菌肽的主要来源是化学合成,但化学合成成本高,量小,不利于大规模应用。所以,我们利用基因工程手段,重组连接多个抗菌肽基因,获得具有广谱抗多种微生物(G⁺、G⁻、病毒、真菌、寄生虫)和免疫调节活性的高效重组抗菌肽分子。

[0006] 有关抗菌肽基因与其它相关基因融合克隆和表达的报道也逐渐增多,但很少见有关将多种均有抗菌活性的短肽基因融合,并在共表达后形成多个活性分子而协同抗菌抗感染提高免疫水平的报道。本发明通过基因重组融合,构建新的具有抗细菌、病毒、真菌及寄

生虫和免疫调节等多种活性的融合抗菌肽基因(PR-39/Tritrpticin/PAMP23/PG1cDNA,) , 将其连接到真核酵母表达技术获得融合蛋白, 进一步通过相对MIC法研究融合蛋白的免疫调节活性及其抗菌、抗病毒活性, 以获得广谱高效抗微生物以及免疫调节作用强的重组蛋白。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是如何提高动物的免疫能力。

[0008] 为解决上述技术问题, 本发明提供了一种蛋白质, 名称为FPAP, 包括4种猪抗菌肽;

[0009] 所述4种猪抗菌肽的氨基酸序列分别为序列1第1-42位、序列1第51-63位、序列1第72-94位和序列1第103-129位。

[0010] 上述蛋白质为如下a) -e) 中任一种蛋白质:

[0011] a) 氨基酸序列包括序列表中序列1所示的氨基酸序列的蛋白质;

[0012] b) 氨基酸序列由序列表中序列1所示的氨基酸残基组成;

[0013] c) 将a) 或b) 所限定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/或添加且具有提高动物免疫能力功能的蛋白质;

[0014] d) 与a) 或b) 所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同源性且具有提高动物免疫能力功能的蛋白质;

[0015] e) a) -d) 中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白。

[0016] 编码上述蛋白的核酸分子也是本发明保护的范畴。

[0017] 上述核酸分子为如下1) -4) 中任一种所示的核酸分子:

[0018] 1) 其编码序列包括序列表中序列2;

[0019] 2) 其编码序列为序列表中序列2;

[0020] 3) 在严格条件下与1) 或2) 限定的DNA分子杂交且编码上述蛋白的DNA分子;

[0021] 4) 与1) 或2) 限定的DNA分子具有80%以上或90%以上的同源性且编码上述蛋白的DNA分子。

[0022] 其中, 所述核酸分子可以是DNA, 如cDNA、基因组DNA或重组DNA; 所述核酸分子也可以是RNA, 如mRNA或hnRNA等。

[0023] 其中, 序列2编码序列1所示的FPAP。

[0024] 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FPAP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FPAP的核苷酸序列75%或者更高同一性的核苷酸, 只要编码FPAP且具有FPAP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。

[0025] 这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括与本发明的编码序列1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85%或更高, 或90%或更高, 或95%或更高同一性的核苷酸序列。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。

[0026] 上述应用中, 所述严格条件是在 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜2次, 每次5min, 又于 $0.5 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜2次, 每次15min;

或, $0.1 \times \text{SSPE}$ (或 $0.1 \times \text{SSC}$)、 0.1% SDS 的溶液中, 65°C 条件下杂交并洗膜。

[0027] 上述 75% 或 75% 以上同一性, 可为 80% 、 85% 、 90% 或 95% 以上的同一性。

[0028] 下述 1)–3) 中的任一种生物材料也是本发明保护的范围:

[0029] 1) 含有上述核酸分子的表达盒;

[0030] 2) 含有上述核酸分子的重组载体;

[0031] 3) 含有上述核酸分子的重组菌或转基因细胞系;

[0032] 4) 所述重组菌的发酵产物。

[0033] 上述应用中, B2) 所述的含有编码 FPAP 的核酸分子的表达盒 (FPAP 基因表达盒), 是指能够在宿主细胞中表达 FPAP 的 DNA, 该 DNA 不但可包括启动 FPAP 基因转录的启动子, 还可包括终止 FPAP 基因转录的终止子。进一步, 所述表达盒还可包括增强子序列。

[0034] 可用现有的载体构建含有所述 FPAP 基因表达盒的重组载体。

[0035] 上述应用中, 所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。所述质粒具体可为 pGAPZ α A 载体。

[0036] B3) 所述重组载体可含有序列 2 所示的用于编码 FPAP 的 DNA 序列。进一步所述重组载体具体可为 pG-p。所述 pG-p 为将 pGAPZ α A 载体的 EcoR I 和 Xba I 识别序列间的 DNA 片段替换为序列 2 所示的 FPAP 基因, 得到的重组载体。

[0037] 上述应用中, 所述微生物可为酵母、细菌、藻或真菌。其中, 酵母可为毕赤酵母 SMD1168。

[0038] 上述应用中, 所述重组微生物可为将含有编码 FPAP 的核酸分子的表达盒导入酵母中得到的重组微生物。所述重组微生物具体可为将含有 FPAP 表达盒的重组载体导入酵母中得到的重组微生物。在将重组载体导入所述酵母中, 可直接将重组载体导入所述酵母中, 也可现将重组载体线性化后再导入所述酵母中。所述酵母可为毕赤酵母 SMD1168。

[0039] 在本发明的一个实施例中, 所述重组微生物为将所述 pG-p 导入毕赤酵母 SMD1168 中得到的重组微生物。所述重组微生物的制备方法具体包括: 将所述 pG-P 线性化, 得到线性化 pG-P; 将所述线性化 pG-P 导入毕赤酵母 SMD1168 中, 得到重组微生物, 该重组微生物的名称为 SMDpG-p。

[0040] 上述应用中, 所述重组微生物的发酵产物可按照包括如下步骤的方法制备: 培养所述重组微生物, 使 FPAP 的编码基因表达, 得到所述重组微生物的发酵产物。

[0041] 上述应用中, 所述转基因细胞系不包括繁殖材料。

[0042] 上述蛋白质或上述核酸分子或上述的生物材料在下述 C1 或 C2 中的应用也是本发明保护的范围:

[0043] C1、在提高动物免疫能力;

[0044] C2、制备提高动物免疫能力产品。

[0045] 上述应用中, 所述提高动物免疫能力为下述 M1–M5 中的至少一种:

[0046] M1、抑制致病微生物的生长;

[0047] M2、促进免疫细胞的增加;

[0048] M3、促进疫苗诱导的免疫应答;

[0049] M4、促进细胞免疫和/或体液免疫;

[0050] M5、提高动物发育和生长增重;

[0051] 和/或,所述致病微生物具体为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、猪肺炎支原体、猪繁殖和呼吸障碍综合症病毒或猪瘟病毒,如大肠杆菌标准菌(G^-)、大肠杆菌耐药菌(G^-)、金黄色葡萄球菌标准菌(G^+)、金黄色葡萄球菌耐药菌(G^+)。

[0052] 和/或,所述免疫细胞具体为淋巴细胞(如CD4+或CD8+)、红细胞或白细胞;

[0053] 和/或,所述抗体具体为IgG、IgG1和/或IgG2a。所述抗体具体可为所述致病微生物的抗体。

[0054] 下述X1或X2任一产品也是本发明保护的范畴:

[0055] X1、生物制剂,含有下述X3a、X3b或X3c:

[0056] X3a、上述蛋白质;

[0057] X3b、上述核酸分子;

[0058] X3c、上述的生物材料;

[0059] X2、用于提高动物免疫能力的成套试剂,由上述X1与抗生素组成。

[0060] 上述产品中,所述生物制剂可以X3a、X3b或X3c为活性成分,还可以将X3a、X3b或X3c与其他可以提高动物免疫能力的物质组合在一起的组合物为活性成分。

[0061] 或,一种提高动物免疫能力的方法,包括对动物施用上述蛋白质或上述核酸分子或上述的生物材料或所述生物制剂或所述成套试剂,提高所述动物的免疫能力。

[0062] 上述中,所述动物为H1-H3中的任一种:

[0063] H1、哺乳动物;

[0064] H2、猪;

[0065] H3、小鼠。

[0066] 上述产品中,所述抗生素可为氨苄霉素和/或卡那霉素。

[0067] 为解决上述技术问题,本发明还提供了提高动物免疫能力的方法,所述方法可包括对动物施用FPAP、所述生物材料或所述生物制剂,提高所述动物的免疫能力。

[0068] 本发明中,所述提高动物免疫能力可为下述M1-M5中的任一种:

[0069] M1、抑制致病微生物的生长;

[0070] M2、促进免疫细胞的增加;

[0071] M3、促进疫苗诱导的免疫应答;

[0072] M4、促进细胞免疫和/或体液免疫;

[0073] M5、提高动物发育和生长增重。

[0074] 所述致病微生物可为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、猪肺炎支原体、猪繁殖和呼吸障碍综合症病毒(PRRSV)或猪瘟病毒(HCV或CSFV),如大肠杆菌标准菌(G^-)、大肠杆菌耐药菌(G^-)、金黄色葡萄球菌标准菌(G^+)、金黄色葡萄球菌耐药菌(G^+)。

[0075] 所述免疫细胞可为淋巴细胞(如CD4+或CD8+)、红细胞或白细胞。

[0076] 所述抗体可为IgG、IgG1和/或IgG2a。所述抗体具体可为所述致病微生物的抗体。

[0077] 所述疫苗具体可为针对所述致病微生物的疫苗。

[0078] 本发明中,所述提高动物免疫能力具体可为提高所述动物对所述致病微生物的免疫能力,如提高对引发猪气喘病(MP)的猪肺炎支原体的免疫能力。

[0079] 本发明中,所述动物可为哺乳动物;所述哺乳动物具体可为猪或小鼠。

[0080] 本发明中,所述提高动物免疫能力产品均可为提高动物免疫能力的药物。

[0081] 实验证明,本发明的共表达FPAP分子及含有FPAP基因的重组酵母的发酵产物具有以下作用:促进动物淋巴细胞、红细胞和白细胞的增加,施用FPAP的动物体内淋巴细胞、红细胞和白细胞含量可提高10%以上;明显抑制致病微生物的生长,施用FPAP的致病微生物的量可降低达20%以上;促进非特异性抗体(IgG、IgG1、IgG2a)及疾病特异抗体的分泌,施用FPAP的动物体内非特异性抗体和疾病特异抗体的含量可提高40%-60%;促进免疫相关基因的表达,进而提高动物的免疫抗感染能力,施用FPAP的动物攻毒存活率明显提高至少60%,生长增重率10%以上。

附图说明

- [0082] 图1为SMDpG-P中目的基因的RT-PCR结果。
- [0083] 图2为SMDpG-P中目的基因在蛋白质表达水平的检测结果。
- [0084] 图3为酵母菌株SMDpG-P发酵上清液对猪淋巴母细胞增殖的影响。
- [0085] 图4为SGP对金黄色葡萄球菌标准菌的抑制作用。
- [0086] 图5为SGP对金黄色葡萄球菌耐药菌的抑制作用。
- [0087] 图6为SGP对大肠杆菌标准菌的抑制作用。
- [0088] 图7为SGP对大肠杆菌耐药菌的抑制作用。
- [0089] 图8为小鼠外周血白细胞在不同的处理下随时间的变化。
- [0090] 图9为小鼠外周血每10000个细胞里CD4+T淋巴细胞的变化。
- [0091] 图10为小鼠外周血每10000个细胞里CD8+T淋巴细胞的变化。
- [0092] 图11为不同组别小鼠外周血IgG水平的变化。
- [0093] 图12为不同组别小鼠外周血IgG1水平的变化。
- [0094] 图13为不同组别小鼠外周血IgG2a水平的变化。
- [0095] 图14为不同组别小鼠外周血MP特异性抗体含量。
- [0096] 图15为不同组别小鼠外周血TNF- α 基因表达水平。
- [0097] 图16为不同组别小鼠外周血IL-4基因表达水平。
- [0098] 图17为不同组别小鼠外周血TLR基因表达水平。
- [0099] 图18为不同组别小鼠外周血免疫记忆相关因子基因表达水平。
- [0100] 图19为不同组别小鼠经大肠杆菌和金黄色葡萄球菌攻毒后存活率。
- [0101] 图20为各组仔猪净增重量。
- [0102] 图21为仔猪实验期间白细胞数量的动态变化。
- [0103] 图22为仔猪实验期间外周血中CD8+T淋巴细胞的动态变化。
- [0104] 图23为仔猪实验期间外周血中CSF特异性抗体的动态变化。
- [0105] 图24为仔猪实验期间外周血中PRRSV特异性抗体的动态变化。
- [0106] 图25为仔猪实验期间外周血TLR基因表达水平。
- [0107] 图26为仔猪实验期间外周血免疫因子基因表达水平。

具体实施方式

- [0108] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 下述实施例中的pGAPZ α A载体为Invitrogen公司产品,产品目录号为V20020。

[0112] 下述实施例中的毕赤酵母SMD1168为Invitrogen公司产品,产品目录号为C17500。

[0113] 下述实施例中的长白猪为四川省种猪性能测定中心简阳基地产品。

[0114] 下述实施例中的藏猪为四川省种猪性能测定中心简阳基地产品。

[0115] 下述实施例中的大肠杆菌标准菌(G⁻)为ATCC(America Type Culture Collection)产品,产品目录号为25922。

[0116] 下述实施例中的大肠杆菌耐药菌(G⁻)为四川大学动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室提供,公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0117] 下述实施例中的金黄色葡萄球菌标准菌(G⁺)为ATCC(America Type Culture Collection)产品,产品目录号为29213。

[0118] 下述实施例中的金黄色葡萄球菌耐药菌(G⁺)为四川大学动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室提供,公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0119] 下述实施例中的雌性ICR小鼠为四川省人民医院实验动物研究所产品。

[0120] 实施例1、猪抗菌肽融合蛋白(FPAP)及其编码基因

[0121] 一、融合蛋白FPAP及其编码基因的获得

[0122] 将4种猪抗菌肽通过连接肽融合,得到融合蛋白,名称为FPAP。

[0123] 该融合蛋白的氨基酸序列如序列表中序列1所示,编码该融合蛋白FPAP的融合基因命名为FPAP,该融合基因的核苷酸序列为序列2。

[0124] 其中,序列1第1-42位为猪抗菌肽PR-39,第43-50位为连接肽,第51-63位为猪抗菌肽Tritrpticin,第64-71位为连接肽,第72-94位为猪抗菌肽PAMP23,第95-102位为连接肽,第103-129位为猪抗菌肽PG1。

[0125] 序列2第1-126位为猪抗菌肽PR-39编码核酸,第127-150位为连接肽编码核酸,第151-189位为猪抗菌肽Tritrpticin编码核酸,第190-213位为连接肽编码核酸,第214-282位为猪抗菌肽PAMP23编码核酸,第283-306位为连接肽编码核酸,第307-387位为猪抗菌肽PG1编码核酸。

[0126] 上述蛋白可以通过人工合成编码核酸,并原核表达获得。

[0127] 二、表达融合蛋白FPAP重组载体的制备

[0128] 重组载体pGAPZ α A-B(简称pG-p)为将pGAPZ α A载体的EcoR I和Xba I识别序列间的DNA片段替换为序列2所示的FPAP基因,保持载体的其他序列不变,得到重组载体,该载体表达序列1所示的猪抗菌肽融合蛋白(FPAP)。

[0129] 三、表达融合蛋白FPAP的重组菌制备

[0130] 1、重组菌制备

[0131] 用AvrII酶切pG-p,得到线性化pG-p;将线性化pG-p导入毕赤酵母SMD1168中,得到重组酵母,将该重组酵母命名为SMDpG-p。

[0132] 采用同样的方法,用AvrII酶切pGAPZ α A,得到线性化pGAPZ α A;将线性化pGAPZ α

A导入毕赤酵母SMD1168中,得到对照重组菌SMDpG。

[0133] 2、重组菌检测

[0134] 1) RNA水平上的表达检测

[0135] 将重组菌SMDpG-p接种在含有100 μ g/ml Zeocin的YPD培养基中28 $^{\circ}$ C,200rpm过夜培养,离心,得到SMDpG-p菌体。提取SMDpG-p菌体总RNA,用引物对(F:5'-ATGTATAAGATGCAGCTCTTGT-3'和R:5'-CTAATGGTGATGGTGATGAT-3')检测SMDpG-p中目的基因的表达量。

[0136] 结果如图1所示,Lane M:20bp DNA Ladder Marker;Lane 1-2:SMDpG-P的RT-PCR扩增带;SMDpG-p中有405bp目的条带,表明SMDpG-p中的融合基因FPAP在RNA水平得到了表达。

[0137] 采用同样的方法检测对照重组菌SMDpG,没有融合基因FPAP的表达。

[0138] 2)、蛋白表达水平检测

[0139] 将重组菌SMDpG-p (SGP) 接种在含有100 μ g/ml Zeocin的YPD培养基中28 $^{\circ}$ C,200rpm发酵培养,分别在发酵不同时间取发酵液进行离心,取上清液,用HIS-Tag的ELISA试剂盒(所有的抗体检测试剂都在里面)检测上清液中的融合蛋白。用对照重组毕赤酵母SMD1168发酵得到的上清液作为阴性对照(对照重组菌SMDpG为对照,其结果已显示在图2中,其OD₄₅₀<0.02,远低于SGP发酵上清液)。

[0140] 结果如图2所示,与毕赤酵母SMD1168相比,重组菌SMDpG-p (SGP) 产生目的融合蛋白FPAP,且在发酵72小时的表达量最高。

[0141] 上述结果表明,重组菌SMDpG-p表达目的融合蛋白FPAP。

[0142] 实施例2、猪抗菌肽融合蛋白(FPAP)对淋巴细胞增殖的影响

[0143] 1、重组菌SMDpG-p发酵上清液的制备

[0144] (1) 将实施例1获得的重组菌SMDpG-p(以下简称SGP)接种于3mL培养基1(培养基1为向YPD培养基中加入博来霉素(Zeocin)得到的液体培养基,且博来霉素的浓度为100mg/mL)中,28 $^{\circ}$ C,200rpm培养过夜活化菌种。

[0145] (2) 取300 μ L步骤(1)得到的菌液接种于含30mL YPD培养基的100mL三角瓶中,28 $^{\circ}$ C,200rpm摇床发酵培养48h(OD₆₀₀为25)。

[0146] (3) 取5mL步骤(2)得到的菌液,于12 000 \times g下离心2min,将得到的上清液命名为SGP发酵上清液。

[0147] 2、蛋白酶处理重组菌SMDpG-p发酵上清液

[0148] 先用pH试纸测上述1得到的SGP发酵上清液的pH,再用2mol/L NaOH和1mo/L HCl分别调SGP发酵上清液到胰蛋白酶的最适作用pH7.0以及胃蛋白酶的最适作用pH 2.0,分别加入胰蛋白酶溶液(北京索莱宝科技有限公司,胰蛋白酶-EDTA消化液(Trypsin-EDTA Solution)含0.25%胰酶和0.02%EDTA,目录号:9002-07-7)和胃蛋白酶溶液(北京索莱宝科技有限公司,0.1%水溶液PH 4.0,酶活:3000-3500NFU/g,目录号:9001-75-6,)模拟消化道酶降解蛋白的作用,使融合蛋白能够独立分开,蛋白酶水解掉链接序列“GSGDDDDK”,使酶终浓度均为0.5mg/mL,37 $^{\circ}$ C水浴酶反应1h,得到胰蛋白酶处理的SGP发酵上清液和胃蛋白酶处理的SGP发酵上清液,于-20 $^{\circ}$ C冰箱备用。

[0149] 按照上述方法,将SMDpG-p替换为SMDpG(以下简称SG),其他步骤均不变,分别得到

SG发酵上清液、胰蛋白酶处理的SG发酵上清液和胃蛋白酶处理的SG发酵上清液,于-20℃冰箱备用。

[0150] 3、融合蛋白FPAP对淋巴细胞增殖的影响

[0151] 1)、长白猪淋巴细胞的制备

[0152] 在无菌条件下,用采血管(含EDTA-2K抗凝)采取长白猪前腔静脉外周血5mL,按照猪淋巴细胞分离液(使用前37℃预热分离液并充分震荡混匀)操作步骤进行分离长白猪淋巴细胞。

[0153] 2)、SMDpG-p发酵产物体外生物学活性检测

[0154] (1)将上述1)分离的猪淋巴细胞培养24h后,将培养皿中的长白猪淋巴母细胞转移至干净的15mL无菌离心管中,1500rpm室温离心15min收集细胞体。

[0155] (2)用RPMI1640完全培养基(含青链霉素双抗、10%胎牛血清)洗涤细胞,反复2次,1500rpm室温离心15min收集细胞沉淀。

[0156] (3)用含20mg/mL α -MM的RPMI1640完全培养基重选细胞并调整细胞个数为约 6×10^6 个/mL,得到细胞悬浮液。

[0157] (4)按照排版向96孔细胞板每孔中加入75 μ L步骤(3)的细胞悬浮液、45 μ L样品液和30 μ L含20mg/mL α -MM(甲基甘露糖苷)的RPMI1640完全培养基。

[0158] 其中样品液分别为步骤1和2获得的SGP发酵上清液、胰蛋白酶处理的SGP发酵上清液、胃蛋白酶处理的SGP发酵上清液、SG发酵上清液、胰蛋白酶处理的SG发酵上清液和胃蛋白酶处理的SG发酵上清液;每孔一种样品液,每种样品液三个复孔。

[0159] 分别采用只含有20mg/mL α -MM的RPMI1640完全培养基、PBS和步骤(3)的细胞悬浮液中作为空白对照。

[0160] 放置于5%CO₂、37℃细胞培养箱培养48h。

[0161] (5)取出96孔细胞板,每孔加入15 μ L CCK8(广州奕源生物科技有限公司)轻轻混匀后放入5%CO₂、37℃细胞培养箱继续培养2h,取出96孔细胞板,用酶标仪(Bio-Reader3350)检测每孔OD₄₅₀。

[0162] 结果如图3所示(步骤(3)的细胞悬浮液中作为空白对照),可以看出,无论是否经过胰蛋白酶或者胃蛋白酶处理,与对照组重组菌SG发酵上清液相比,SGP发酵上清液刺激猪淋巴母细胞得到的淋巴细胞均显著增加($P < 0.05$);表明,融合蛋白FPAP可以显著刺激猪淋巴细胞增殖($P < 0.05$)。

[0163] 图3中,未处理表示未经胰蛋白酶处理和未经胃蛋白酶处理的发酵上清液。

[0164] 实施例3、猪抗菌肽融合蛋白(FPAP)的抑菌活性检测

[0165] 测定猪抗菌肽融合蛋白FPAP对大肠杆菌标准菌(G⁻)(以下简称为S-G⁻)、大肠杆菌耐药菌(G⁻)(以下简称为R-G⁻)、金黄色葡萄球菌标准菌(G⁺)(以下简称为S-G⁺)、金黄色葡萄球菌耐药菌(G⁺)(以下简称为R-G⁺)抑菌情况,具体方法如下:

[0166] 首先将4种细菌菌株接种活化并培养其处于指数生长期(OD₆₀₀大约为0.5),然后用LB培养液稀释到OD₆₀₀约0.005,将稀释后的菌液接种到96孔细胞培养板上,100 μ L/每孔,每个96孔细胞培养板一种细菌。

[0167] 针对每个含有细菌的96孔细胞培养板按照以下方式处理:将100 μ L样品液加入实验孔中轻轻混匀,每个样品设3个重复孔;

[0168] 其中样品液为实施例2的步骤1和2获得的SGP发酵上清液(即未处理的SGP发酵上清液)、胰蛋白酶处理的SGP发酵上清液、胃蛋白酶处理的SGP发酵上清液,并将实施例2的步骤1和2获得的SG发酵上清液、胰蛋白酶处理的SG发酵上清液和胃蛋白酶处理的SG发酵上清液作为相应的空对照。

[0169] 每种菌均设四种抗生素梯度作为阳性对照(抗生素和LB培养液);每种菌均设只加LB培养液作为阴性对照,并设不含菌的LB培养液作为空白对照。

[0170] 将96孔细胞培养板置37℃培养箱孵育2h、16h后,分别用酶标仪(Bio-Reader3350)检测每孔OD₆₀₀值。

[0171] S-G⁻和S-G⁺的四种抗生素梯度均如表1所示,R-G⁻和R-G⁺的四种抗生素梯度均如表2所示。

[0172] 表1、标准菌株抗生素梯度

浓度 度	抗生素梯 度 1	抗生素梯 度 2	抗生素梯 度 3	抗生素梯度 4
名称				
氨苄霉素	100μg/mL	200μg/mL	400μg/mL	600μg/mL
卡那霉素	——	——	100μg/mL	200μg/mL

[0175] 注:表1中,“——”表示不含卡那霉素。

[0176] 表2、耐药菌株抗生素梯度

浓度 名称	抗生素梯度 1	抗生素梯度 2	抗生素梯度 3	抗生素梯度 4
氨苄霉素	200μg/mL	400μg/mL	800μg/mL	1mg/mL
卡那霉素	100μg/mL	200μg/mL	400μg/mL	600μg/mL

[0178] 结果显示,对于这四种菌中的每一种菌,SG的各种样品液的OD₆₀₀与阴性对照的OD₆₀₀的在16h时均无显著差异,表明SG对这四种菌均无抑制作用;SGP的各种样品液的OD₆₀₀在16h时均显著低于相应时间下的空对照的OD₆₀₀(P<0.05)。

[0179] 16h时的结果如图4-图7所示(空对照均为SG发酵上清液),SGP的发酵上清液对这四种菌均有明显的抑制作用。表明融合蛋白FPAP可以抑制大肠杆菌标准菌、大肠杆菌耐药菌、金黄色葡萄球菌标准菌和金黄色葡萄球菌耐药菌的生长增殖。

[0180] 实施例4、猪抗菌肽融合蛋白(FPAP)在小鼠体内生物学活性研究

[0181] 1、发酵产物的准备

[0182] 发酵:将实施例1获得的重组菌SMDpG-p(以下简称SGP)活化并接种于含30mL YPD培养基的100mL三角瓶中,在30℃,220rpm下培养48h,使OD₆₀₀约为25,得到SGP发酵液。

[0183] 按照上述方法,将对照重组菌SMDpG发酵,得到SG发酵液。

[0184] 2、实验ICR小鼠分组

[0185] 取50只18-20g 3周龄健康雌性ICR小鼠,随机分组5组,每组10只小鼠,组别编号为

1-5,其中组1、组4为SG阴性对照组,组3为疫苗阴性对照组,组2、组5为实验组。

[0186] 3、小鼠饲养和疫苗接种

[0187] 按照分组情况,用灌胃针将新鲜发酵液送至小鼠胃内,0.6mL/只,将第一次灌胃记为灌胃第0天,每隔两天灌胃一次,连续4周(即分别在灌胃第0天、第3天、第6天、第9天、第12天、第15天、第18天、第21天、第24天和第27天灌胃相应的发酵液,每次灌胃量均为0.6mL/只)。为保证重组蛋白活性,每次动物灌胃前要进行新鲜重组毕赤酵母菌液发酵。

[0188] 接种疫苗时,只在灌胃第7天时肌肉注射(肌注),0.2mL/只。

[0189] 具体操作如下所示(表3),其中,猪气喘病(MP)疫苗均为华派生物工程集团有限公司生产的产品(目录号:19200003)。

[0190] 表3、小鼠灌胃、疫苗接种剂量

[0191]

组别	分子制剂	接种方式	接种剂量
1	SG 发酵液	灌胃	0.6mL/只
2	SGP 发酵液	灌胃	0.6mL/只
3	MP 疫苗	肌注	0.2 mL/只
4	SG 发酵液+MP 疫苗	灌胃+肌注	0.6mL/只+0.2 mL/只
5	SGP 发酵液+MP 疫苗	灌胃+肌注	0.6mL/只+0.2 mL/只

[0192] 表3中,灌胃均为发酵液的接种方式,0.6mL/只均为发酵液的接种剂量;肌注均为疫苗的接种方式,0.2mL/只均为疫苗的接种剂量。

[0193] 分别在灌胃前、灌胃第7天、灌胃第14天、灌胃第21天和灌胃第28天采取每只小鼠尾静脉血,进行如下实验内容:30μL全血与30μL生理盐水混匀后在血球计数仪做血常规;50μL全血做流式细胞测定;100μL全血提取RNA后实时定量免疫相关基因;100μL全血加1mL TRIZOL剧烈混匀-80℃保存备用;200μL全血低速离心收集血浆检测抗体。

[0194] 4、攻毒实验

[0195] 将高耐药致死大肠杆菌(四川大学动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室提供,目录号:SCSU-ECOLI—HRL-1012)接种于含0.1mg/ml氨苄霉素和0.1mg/ml卡那霉素LB液体培养基里活化,将活化后的新鲜菌液接种于LB液体培养基中37℃,1500rpm培养至对数期离心收集菌体,用新鲜的LB液体培养基将其重悬至 5.0×10^5 CFU/ml,得到大肠杆菌发酵液。预实验摸索大肠杆菌发酵液对7周龄健康雌性ICR小鼠的半致死剂量为0.1ml。灌胃第28天在每组中随机选取5只小鼠腹腔注射大肠杆菌发酵液,每只小鼠的注射量均为半致死剂量,腹腔注射当天即为攻毒后第0天。每24h观察一次小鼠的发病情况,并统计小鼠存活率,解剖观察死亡的小鼠内部器官的变化。

[0196] 将高耐药致死金黄色葡萄球菌(四川大学动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室提供,目录号:SCSU-STREPC—HRL-2026)接种于含0.1mg/ml氨苄霉素和0.1mg/ml卡那霉素LB液体培养基里活化,将活化后的新鲜菌液接种于LB液体培养基中37℃,1500rpm培养至对数期离心收集菌体,用新鲜的LB液体培养基将其重悬至 5.0×10^5 CFU/ml,得到金黄色葡萄球菌发酵液。预实验摸索金黄色葡萄球菌发酵液对7周龄健康雌性ICR小鼠的半致死剂量为0.2ml。灌胃第28天对每组中剩余的未注射大肠杆菌发酵液的5只小鼠腹腔注射金黄色

葡萄球菌发酵液,每只小鼠的注射量均为半致死剂量,腹腔注射当天也为攻毒后第0天。每24h观察一次小鼠的发病情况,并统计小鼠存活率,解剖观察死亡的小鼠内部器官的变化。

[0197] 5、实验结果分析

[0198] 每组小鼠血常规检测外周血白细胞变化的结果如图8所示,SG表示空白对照菌发酵液,实验组小鼠外周血白细胞的含量显著高于SG阴性对照组与疫苗阴性对照组 ($P < 0.05$);SMDpG-p发酵产物能有效地刺激免疫细胞增殖,表明融合蛋白FPAP有效地刺激免疫细胞增殖。

[0199] 参照流式细胞操作步骤处理样品,避光低温上机检测Th (CD4+淋巴细胞)、Tc (CD8+淋巴细胞)细胞数量,流式细胞测定结果如图9和图10,显示随机选取小鼠外周血每10000个细胞里CD4+和CD8+T淋巴细胞的变化;由图可知,经免疫接种后的实验小鼠外周血CD4+和CD8+的含量均显著高于SG阴性对照组与疫苗阴性对照组 ($P < 0.05$),都在免疫后21或28天达到峰值。说明SMDpG-p发酵产物具有刺激实验小鼠免疫应答的功能,表明融合蛋白FPAP有效地刺激免疫细胞增殖。

[0200] 将低速离心收集的血浆按照ELISA试剂盒的操作步骤检测非特异性抗体IgG、IgG1、IgG2a,并检测特异性抗体MP抗体的抗体滴度,采用的试剂盒分别为小鼠免疫球蛋白G1 (IgG1) ELISA试剂盒(货号69-210245)、小鼠免疫球蛋白G (IgG) ELISA试剂盒(货号59-20037)、小鼠免疫球蛋白G (IgG2a) ELISA试剂盒(货号69-210250)、猪支原体抗体elisa试剂盒(货号69-40349),以上各试剂盒均为武汉默沙克生物科技有限公司产品。

[0201] 结果如图11、12、13所示,显示经免疫接种后的实验小鼠外周血血清中IgG、IgG1、IgG2a水平较SG阴性对照组与疫苗阴性对照组显著增加 ($P < 0.05$),都在免疫后14或28天达到峰值。说明SMDpG-p发酵产物能刺激免疫小鼠体内产生更多的IgG、IgG1、IgG2a抗体。图14显示了经免疫接种后的实验小鼠外周血血清中MP(支原体)的抗体滴度,随着时间的增加,各个组的抗体滴度逐渐下降,但是实验组显著高于SG阴性对照组与疫苗阴性对照组 ($P < 0.05$)。说明了SMDpG-p发酵产物可以显著提高疫苗诱导的免疫应答效果,表明融合蛋白FPAP有效地刺激产生抗体。

[0202] 检测小鼠免疫相关基因在RNA水平上的表达情况,以全血提取RNA作为模板,用表4所示的引物进行扩增,检测小鼠免疫相关基因的表达,内参基因为肌动蛋白 β -actin。

[0203] 表4为引物

[0204]

基因	引物名称	引物序列(5' -3')
TLR-1	TLR-1-F	GGACCTACCCTTGCAAACAA
	TLR-1-R	GGTGGCACAAGATCACCTTT
TLR-4	TLR-4-F	ATATGGCAGAGGTGAAAGCAC
	TLR-4-R	GAAGGCAGAGATGAAAAGGGG
TNF- α	TNF- α -F	CCTGTAGCCCACGTCGTAG
	TNF- α -R	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-4	IL-4-F	GCCATATCCACGGATGCGACAA
	IL-4-R	GGTGTCTTCGTTGCTGTGAGGA
IL-7	IL-7-F	TTCCTCCACTGATCCTTGTCT

	IL-7-R	AGCAGCTTCCTTTGTATCATCAC
IL-23	IL-23-F	TCAGACATTTTCACAGGGAGC
	IL-23-R	ACCCTCGGGCTGCAAGAGT

[0205] TNF- α 是重要的Th1型细胞因子,主要参与Th1细胞的分化和细胞免疫,其动态变化如图15所示,实验组显著高于SG阴性对照组与疫苗阴性对照组($P<0.05$),且在免疫接种后第21天达到峰值。Th2细胞分泌IL4细胞因子,参与机体的体液免疫,其动态变化如图16所示,实验组显著高于SG阴性对照组与疫苗阴性对照组($P<0.05$),且在14至21天达到峰值。结果表明,SMDpG-p发酵产物能够同时促进细胞免疫和体液免疫,即融合蛋白FPAP能够同时促进细胞免疫和体液免疫。

[0206] 图17为TLR基因表达水平的动态变化,结果显示免疫接种后,TLR1基因和TLR4基因的表达水平明显上升($P<0.05$),且实验组小鼠的TLR基因表达水平较SG阴性对照组与疫苗阴性对照组显著增加($P<0.05$),在免疫后21天达到峰值。

[0207] 图18为免疫记忆相关基因表达水平的动态变化,总体显示,免疫接种后,实验组小鼠的IL-23基因和IL-7基因表达水平均较SG阴性对照组与疫苗阴性对照组显著增加($P<0.05$)。

[0208] 攻毒后第5天,针对腹腔注射大肠杆菌发酵液的小鼠,实验组的小鼠存活率显著高于SG阴性对照组与疫苗阴性对照组(图19),针对腹腔注射金黄色葡萄球菌发酵液的小鼠,实验组的小鼠存活率显著高于SG阴性对照组与疫苗阴性对照组,说明实验组的SMDp46B能够有效的保护小鼠,使其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抵抗力显著增强,即融合蛋白FPAP能够提高小鼠被致病菌攻毒后的存活率。对死亡小鼠经过解剖发现,大肠杆菌致死的小鼠腹腔内消化道有明显病变,脾脏发黑,肝脏发黑,金黄色葡萄球菌感染致死的小鼠腹腔内消化道无明显病变,脾脏发黑,肝脏正常。

[0209] 实施例5、融合蛋白FPAP在仔猪体内生物学活性研究

[0210] 1、发酵产物的准备

[0211] 发酵:将实施例1获得的重组菌SMDpG-p(以下简称SGP)活化并接种于含30mL YPD培养基的100mL三角瓶中,在30 $^{\circ}$ C,220rpm下培养48h,使OD₆₀₀约为40,得到SGP发酵液。

[0212] 按照上述方法,将对照重组菌SMDpG发酵,得到SG发酵液。

[0213] 2、实验动物饲喂发酵液

[0214] 选取18头体重约9kg的45日龄杜大长杂交仔猪,由四川省种猪性能测定中心简阳基地提供,随机分为实验组(9头)与对照组(9头)。对实验组每头猪饲喂步骤1的SGP发酵液,对对照组每头猪饲喂步骤1的SG发酵液,饲喂量均为12.5ml/kg体重,喂养28天,每隔1天饲喂一次,将第一次饲喂前一天记为喂养0天。所有实验猪均接受相同的猪瘟弱毒疫苗(中牧股份成都药械厂,产品目录号:220051001)和蓝耳病灭活疫苗(中牧股份成都药械厂,产品目录号:22003)常规肌肉注射免疫;分别在喂养0天、7天、14天、28天、42天对所有仔猪采血前腔静脉血3-4mL于含有EDTA-K2真空管中,其后用于血样的免疫细胞变化,在喂养0天、14、28天、42天对所有仔猪称重。

[0215] 3、实验仔猪体重变化

[0216] 在喂养0天、14天、28天和42天对各组实验仔猪进行称重,结果(图20)显示,实验组仔猪在喂养14天、28天和42天平均增加的体重分别为对照组的1.71、1.37和1.19倍,差异均

达到显著水平 ($P < 0.05$) ;说明SGP有效地促进了仔猪生长。

[0217] 4、实验仔猪外周血白细胞数量的动态变化

[0218] 将在喂养0天、7天、14天、28天和42天取的血样按组别混合在一起,用常规血细胞分析仪测量血样中白细胞的数量。结果(图21)显示,在喂养42天SGP实验组白细胞数量显著高于SG对照组 ($P < 0.05$)。说明融合蛋白FPAP可以有效地增加使用对象的外周血免疫细胞数量,从而增强免疫。

[0219] 5、实验仔猪外周血CD8+T淋巴细胞亚群的检测

[0220] 将在喂养7天、14天、28天和42天取的血样按组别混合在一起,用于流式细胞检测外周血中CD8+T淋巴细胞亚群的数量,采用Mouse Anti-Porcine CD8a-SPRD (Southern Biotech公司,货号4520-13)和1 μ l Mouse Anti-Porcine CD3 ϵ -FITC (Southern Biotech公司,货号4510-02)进行,具体步骤如下:

[0221] (1)取新鲜抗凝猪仔静脉血100 μ l (白细胞数量约为 10^5 - 10^7 个),加入60 μ l生理盐水;

[0222] (2)吸取2 μ l Mouse Anti-Porcine CD8a-SPRD (Southern Biotech公司,货号4520-13)和1 μ l Mouse Anti-Porcine CD3 ϵ -FITC (Southern Biotech公司,货号4510-02)至1.5mlEP管中,混匀,孵育20min;

[0223] (3)流式细胞仪专用试管中加入0.2ml 10x红细胞裂解液,再加入1.8mlPBS,将孵育好的血液加入裂解液中,裂解5min,待血细胞裂解完全;

[0224] (4)1500rpm离心5min,弃上清。加入2mlPBS,吹打混匀,悬浮细胞;

[0225] (5)1500rpm离心5min,弃上清,留约150 μ l PBS轻轻吹打混匀,共洗涤1-2次,洗涤液的用量通常应至少为细胞沉淀体积的5倍;

[0226] (6)用150 μ l PBS吹打混匀细胞待检测。

[0227] 结果如图22显示,在喂养7天、14天、28天和42天,SGP实验组CD8+T淋巴细胞数量均显著高于SG对照组 ($P < 0.05$)。说明融合蛋白FPAP可以有效地刺激仔猪的免疫应答功能。

[0228] 6、CSF和PRRSV特异性抗体的ELISA检测:

[0229] 将低速离心收集的血浆按照ELISA试剂盒(猪瘟抗体(CSF Ab)ELISA试剂盒、猪蓝耳病毒ELISA试剂盒)的操作步骤检测特异性抗体。

[0230] 图23和图24分别为仔猪生长期间外周血中猪瘟(CSF)特异性抗体和蓝耳病(PRRS)特异性抗体的动态变化图,图中明显可见,在喂养0天、14天、28天和42天,SGP实验组中两种特异性抗体的数量均显著高于SG对照组 ($P < 0.05$)。说明融合蛋白FPAP可以显著地增强疫苗诱导的免疫应答,从而增加疫苗的保护率。

[0231] 7、免疫相关基因的表达变化

[0232] 检测仔猪免疫相关基因在RNA水平上的表达情况,免疫相关基因及引物如表5所示,内参为肌动蛋白 β -actin。

[0233] 表5、定量引物

基因	引物名称	引物序列 (5' -3')
TLR-4	TLR-4-F	ATATGGCAGAGGTGAAAGCAC
	TLR-4-R	GAAGGCAGAGATGAAAAGGGG
TLR-7	TLR-7-F	ATAGCGAGCATCACTCCAGCC
	TLR-7-R	TAATCTGCTGCCTTCTGGTGC
IL-10	IL-10-F	GCTGGAGGACTTTAAGGGTTAC
	IL-10-R	GAGTTCACGTGCTCCTTGATAT
IL-12	IL-12 (p40) -F	GAGGTCGTGCTGGAAGCTGTT
	IL-12 (p40) -R	TCTTGGGAGGGTCTGGTTTGA
IL-23	IL-23-F	TCAGACATTTTCACAGGGGAGC
	IL-23-R	ACCCTCGGGCTGCAAGAGT
CD62L	CD62L-F	CGCTTCCCTTCAGTCGTAGTTACT
	CD62L-R	GCAGGCATCATCATTCCACTTCC
IFN- γ	IFN- γ -F	GAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGAC
	IFN- γ -R	TCCATGCTCCTTTGAATGGC
CD45	CD45-F	GGACATGTGACCTGGAAACC
[0235]	CD45-R	CCATTACGCTCTGCTTTTCC

[0236] 图25为TLR基因表达水平的动态变化,结果显示免疫接种后,TLR-4和TRL-7基因的表达水平明显上升 ($P < 0.05$),且实验猪的TLR-4和TLR7基因表达水平较SG阴性对照组显著增加 ($P < 0.05$)。

[0237] 图26为免疫相关基因表达水平的动态变化,结果显示免疫接种后,实验猪的IL-10、IFN- γ 、IL-12、IL-23的基因表达水平在7-42天、7-28天和7-42天时SGP明显高于SG组 ($P < 0.05$);CD45和CD62L基因的表达水平也较对照组明显上升 ($P < 0.05$),在免疫后7-14天达到峰值。

[0238] 这些结果表明融合蛋白FPAP能提高实验猪猪瘟 (CSF) 和蓝耳病 (PRRS) 疫苗免疫后相关免疫基因的表达,增强其先天免疫、特异性体液和细胞免疫应答反应。

序列表

<110> 深圳市前海金卓生物技术有限公司, 四川大学

<120> 融合猪抗菌肽FPAP重组酵母菌制剂的制备及应用

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

```

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro
1           5           10           15
Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro
           20           25           30
Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro Gly Lys Arg Gly Ser Gly Asp Asp Asp
           35           40           45
Asp Lys Val Arg Arg Phe Pro Trp Trp Trp Pro Phe Leu Arg Arg Gly
           50           55           60
Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Arg Ile Ile Asp Leu Leu Trp Arg Val
65           70           75           80
Arg Arg Pro Gln Lys Pro Lys Phe Val Thr Val Trp Val Arg Gly Ser
           85           90           95
Gly Asp Asp Asp Asp Lys Arg Gly Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Arg Arg
           100          105          110
Arg Phe Cys Val Cys Val Gly Arg Gly Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp
           115          120          125
Lys His His His His His His
           130          135

```

<210> 2

<211> 405

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

aggagacgtc cccgaccccc atatttgcca aggccaaaggc cacctccggtt tttcccacca 60

aggttgccac cacgtatccc accagggttc ccaccaaggt tcccaccacg gttccccgga 120
aaacggggat cgggagatga cgatgacaag gtacgacgtt tcccatggtg gtggcctttc 180
ttgcgacgtg gatccggaga tgacgatgac aagaggatta ttgacttgtt gtggagagta 240
cgtcggccac agaaacccaa atttgtgact gtatgggtca gaggatccgg agatgacgat 300
gacaagaggg gaggtcgcct gtgctattgt aggcgtaggt tctgcgtctg tgtcggacga 360
ggaggatccg gagatgacga tgacaagcat catcaccatc accat 405

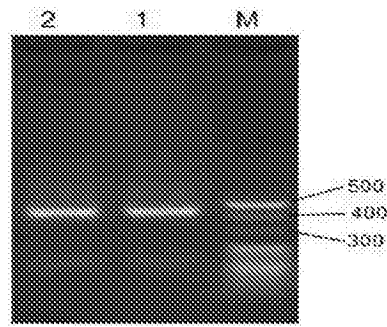


图1

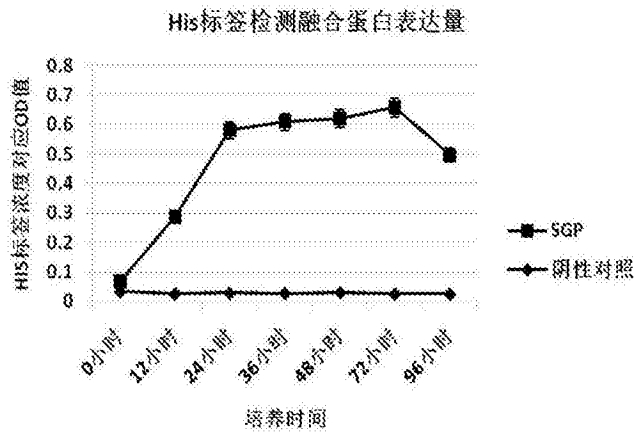


图2

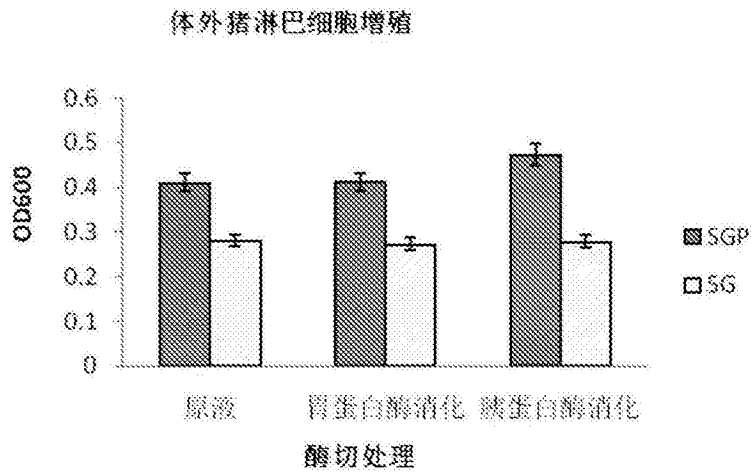


图3

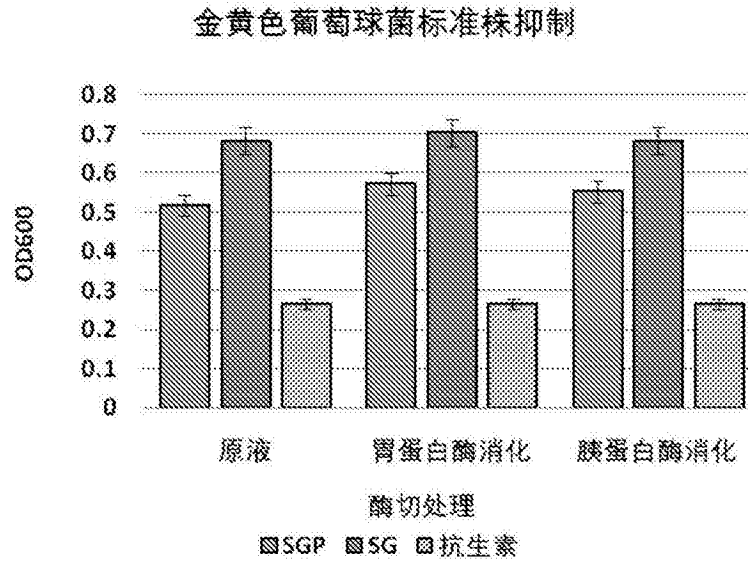


图4

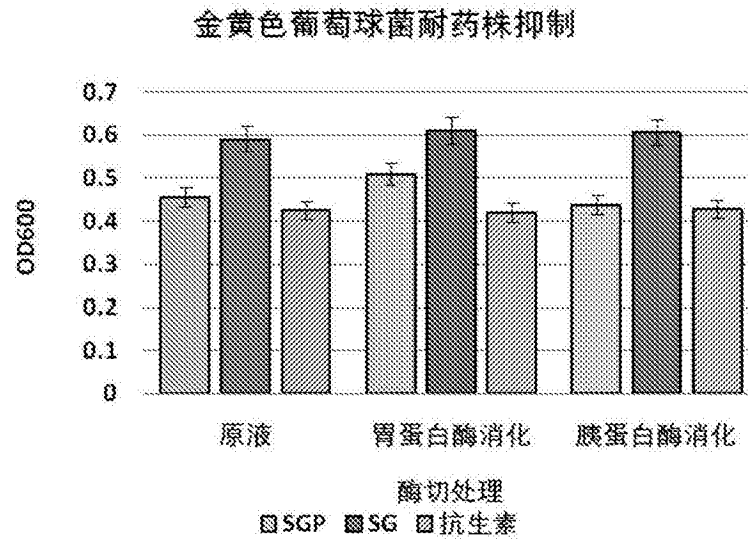


图5

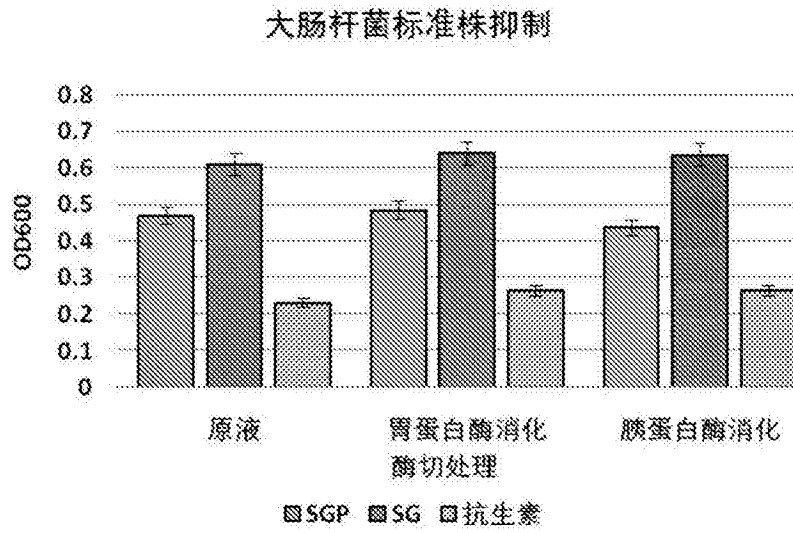


图6

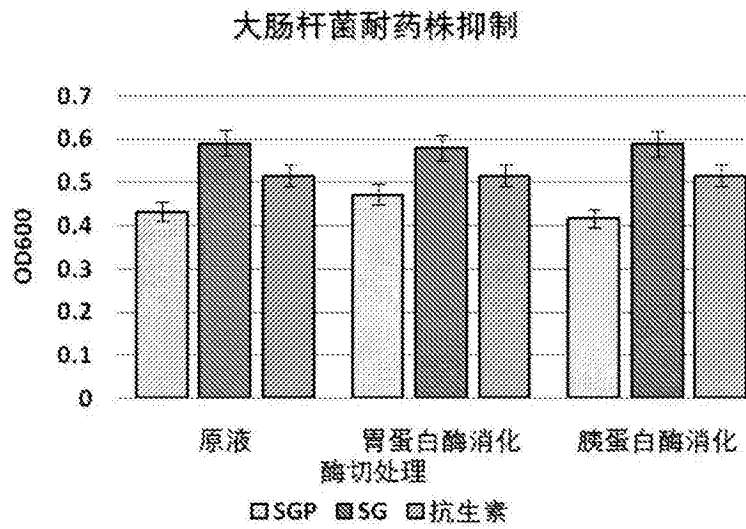


图7

小鼠外周血白细胞总数

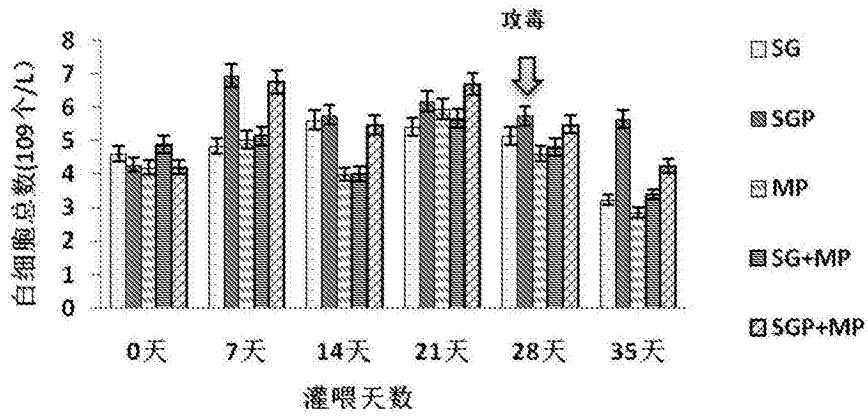


图8

CD4+T淋巴细胞

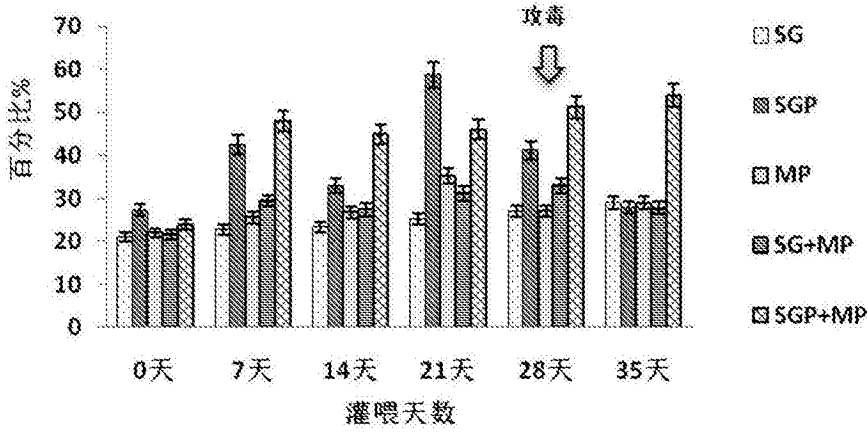


图9

CD8+T淋巴细胞

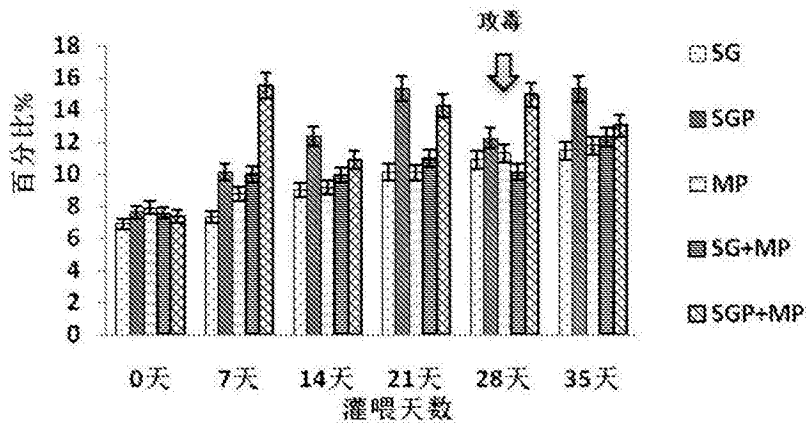


图10

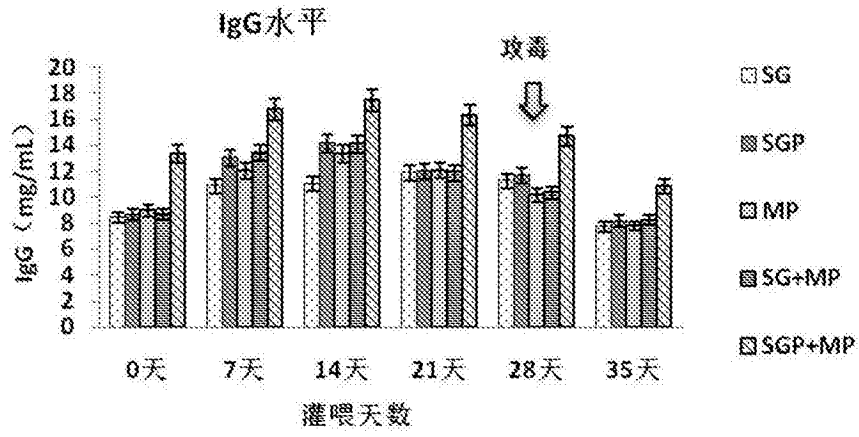


图11

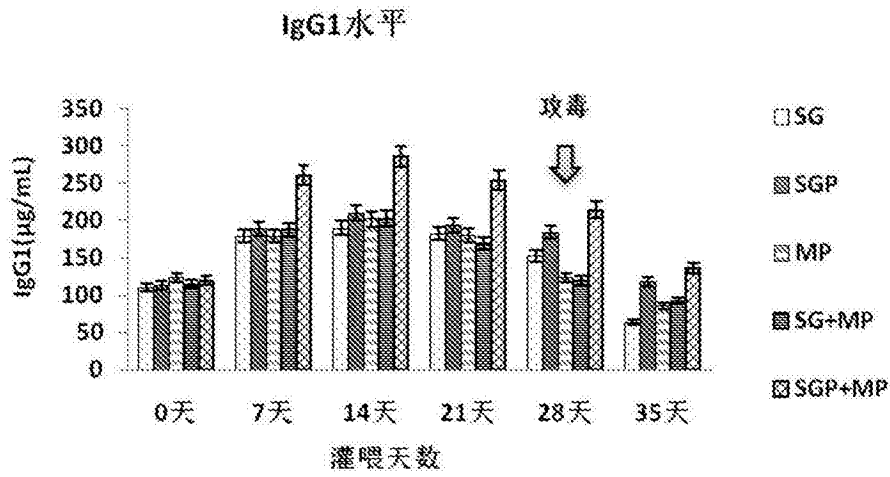


图12

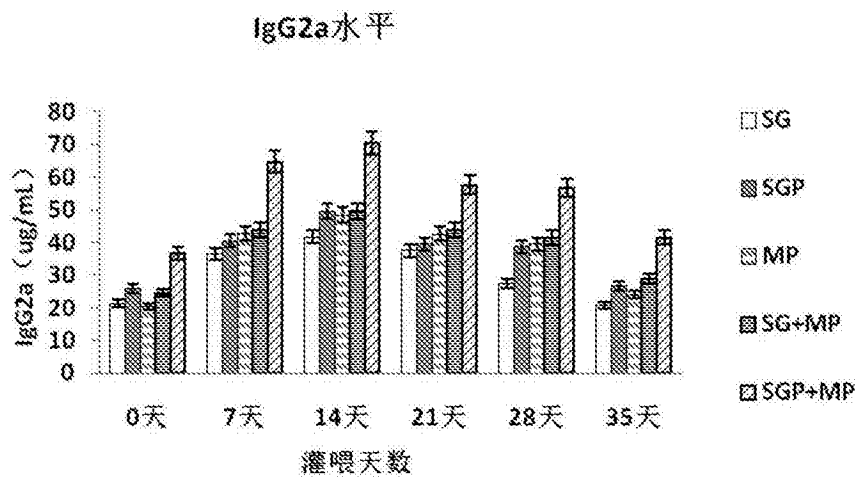


图13

MP特异性抗体水平

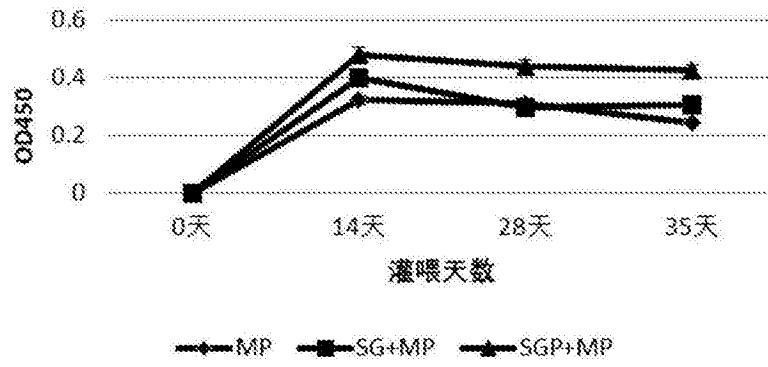


图14

TNF- α

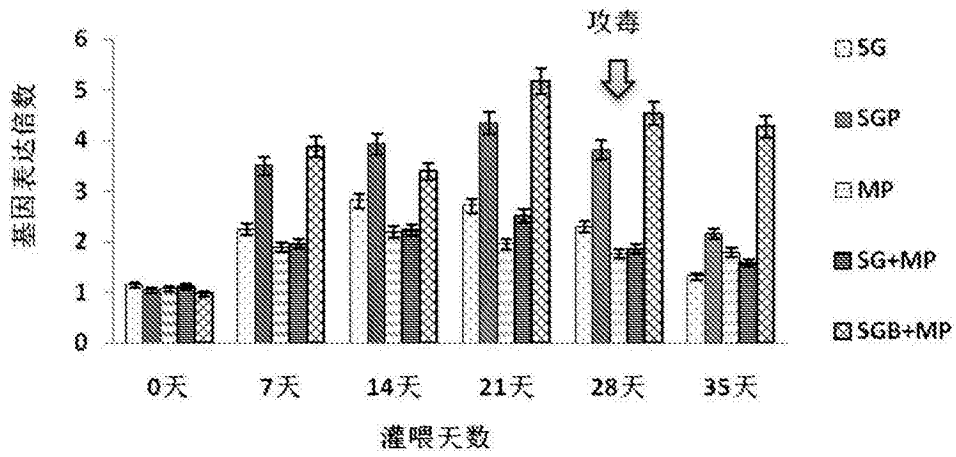


图15

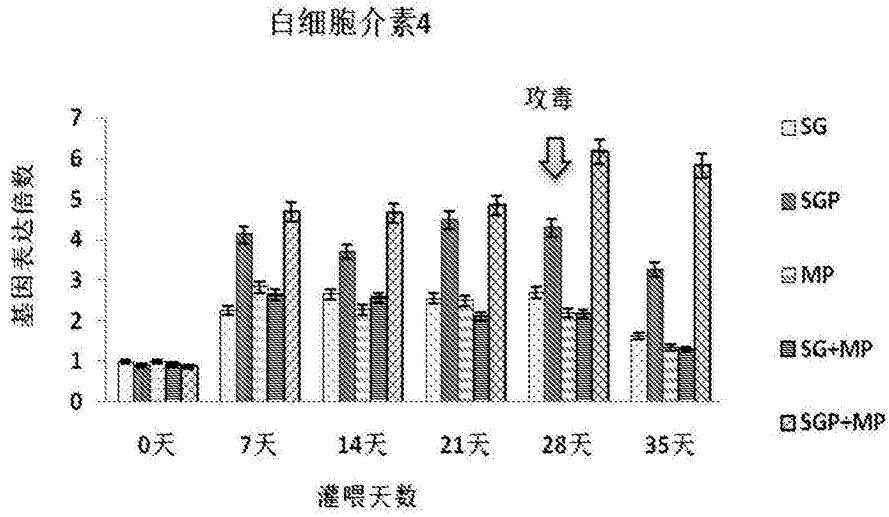


图16

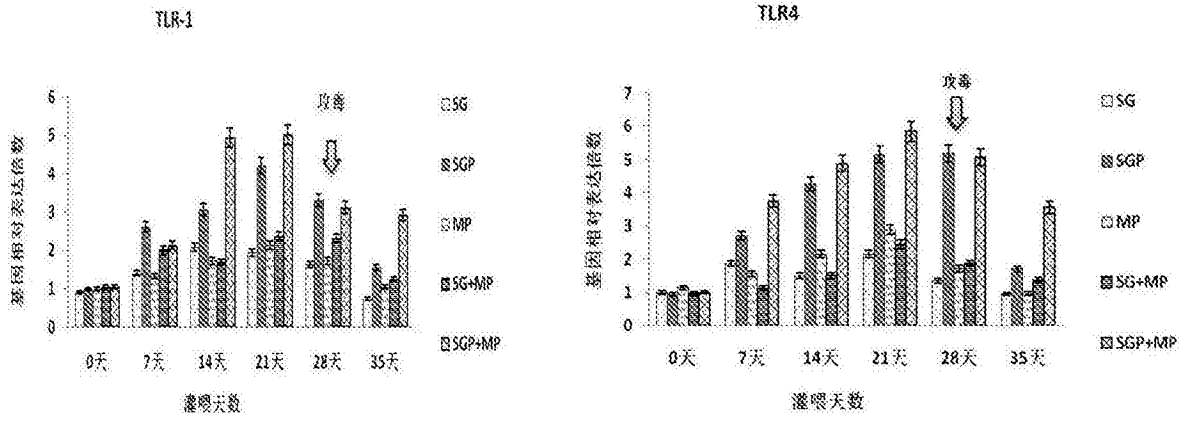


图17

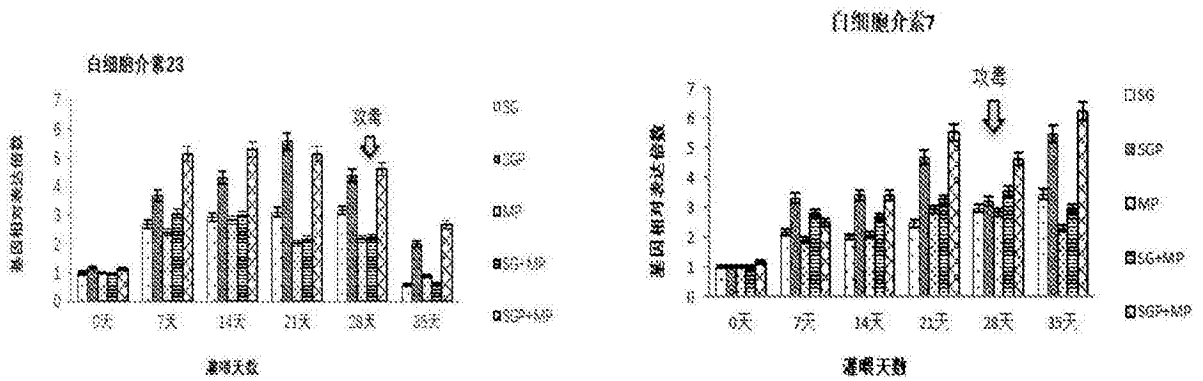


图18

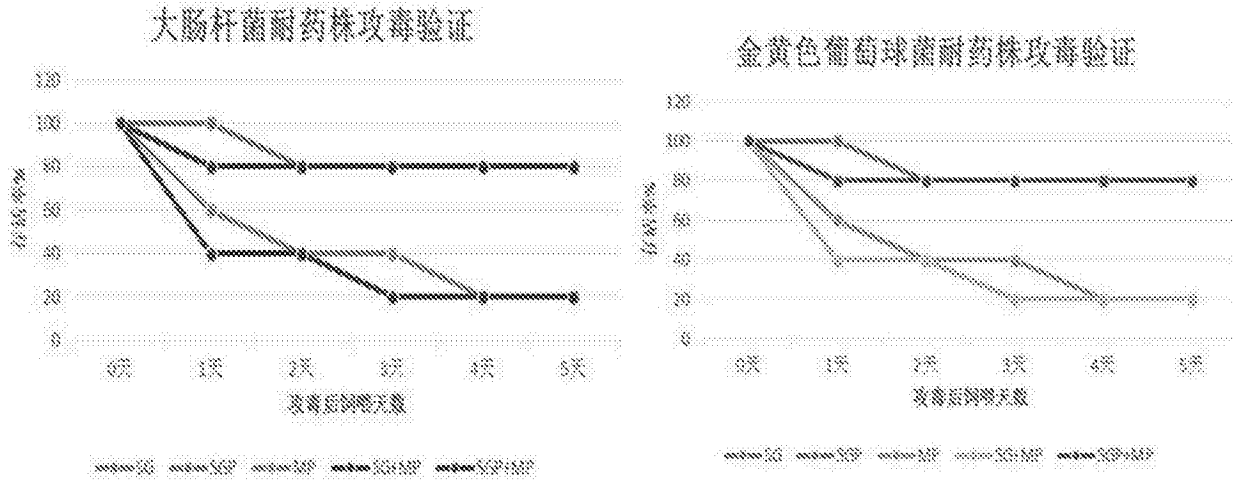


图19

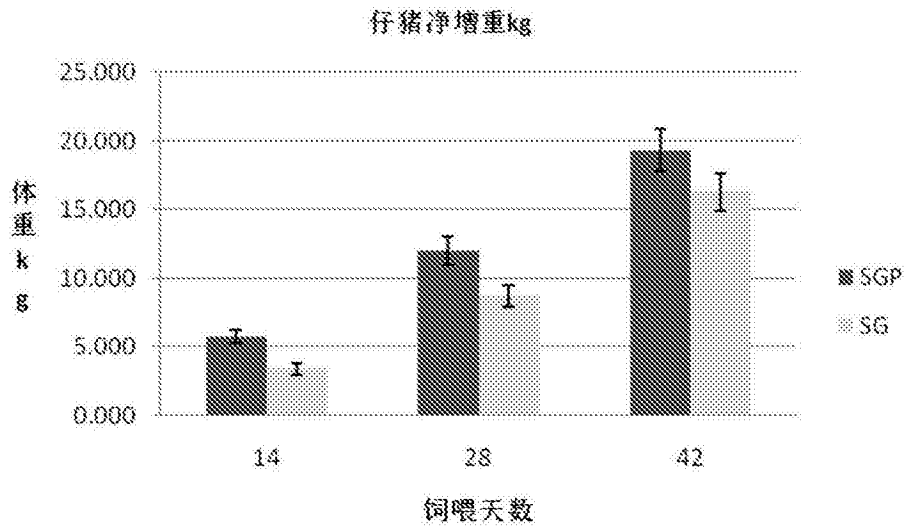


图20

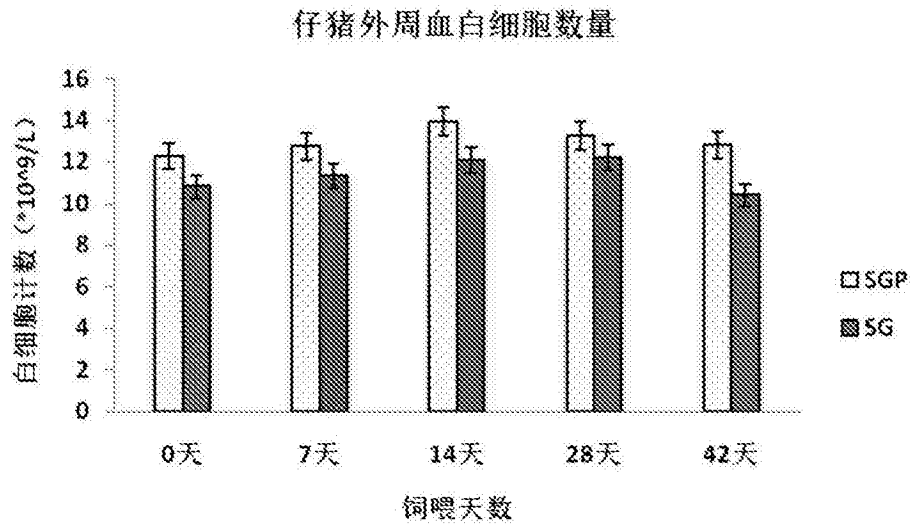


图21

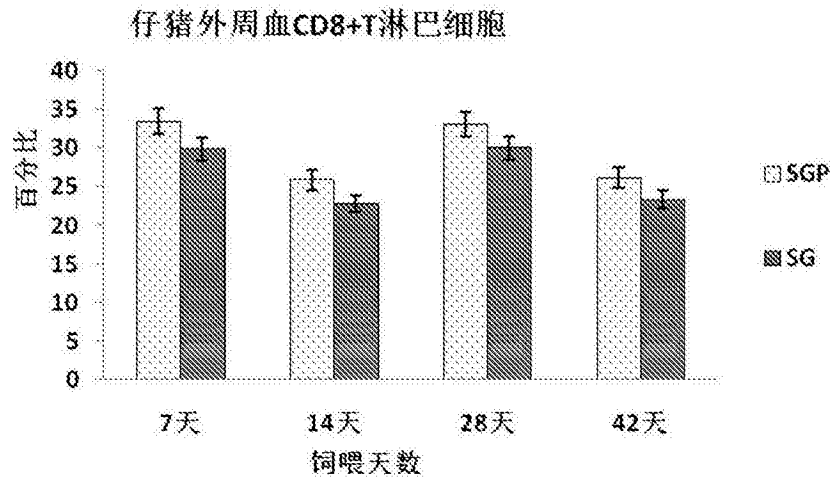


图22

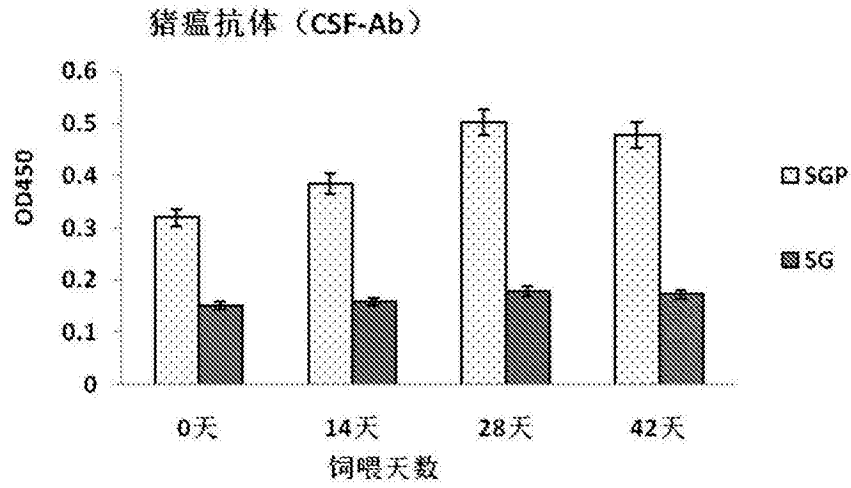


图23

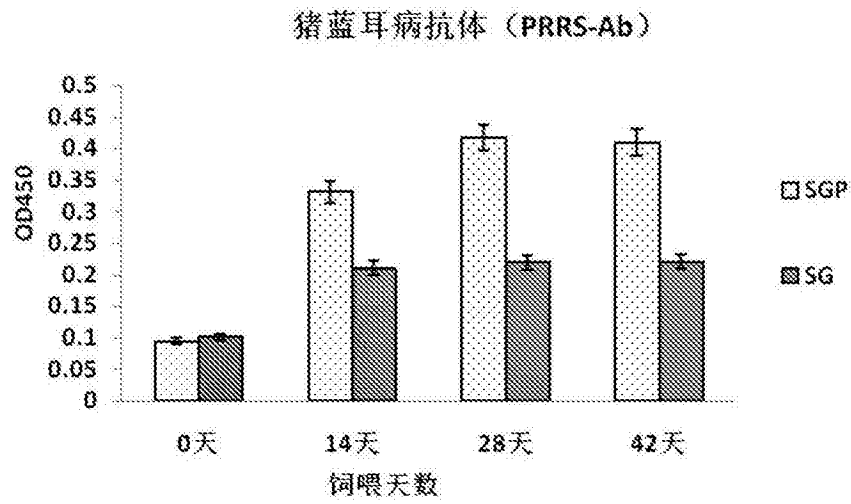


图24

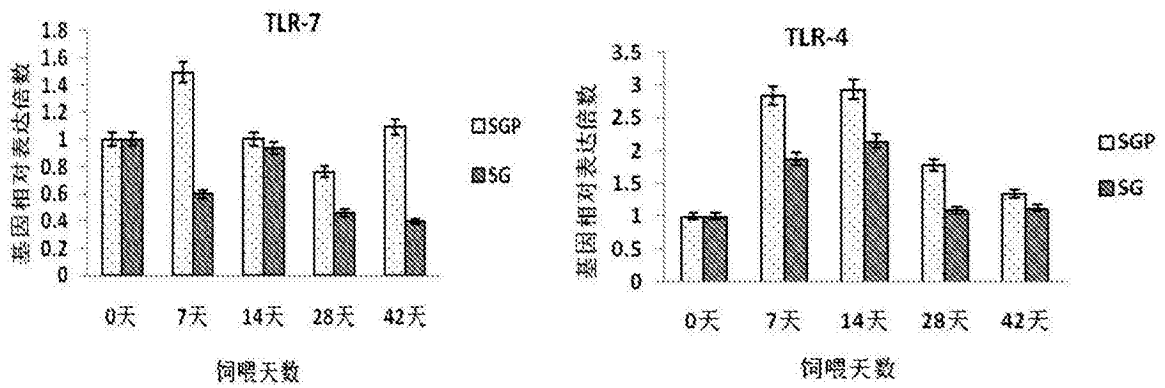


图25

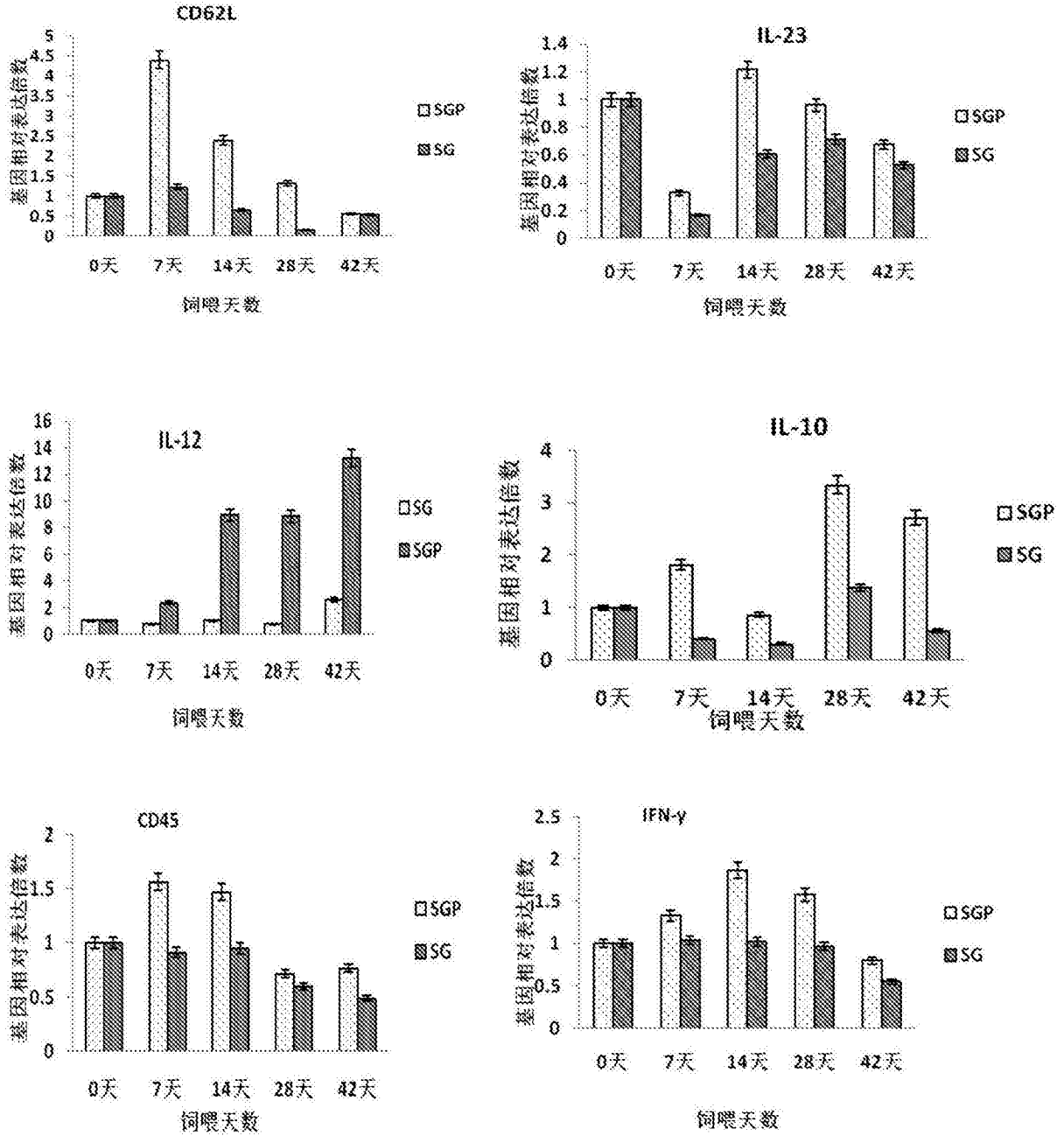


图26