



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103820472 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201410035942. 3

(22) 申请日 2014. 01. 25

(71) 申请人 北京工业大学

地址 100124 北京市朝阳区平乐园 100 号

(72) 发明人 周玉柏 曾毅 方军 刘海庭

沈思嗣 李劲涛 李泽琳

(74) 专利代理机构 北京思海天达知识产权代理

有限公司 11203

代理人 刘萍

(51) Int. Cl.

C12N 15/37(2006. 01)

C12N 15/85(2006. 01)

C12N 15/66(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61K 39/12(2006. 01)

A61P 31/20(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

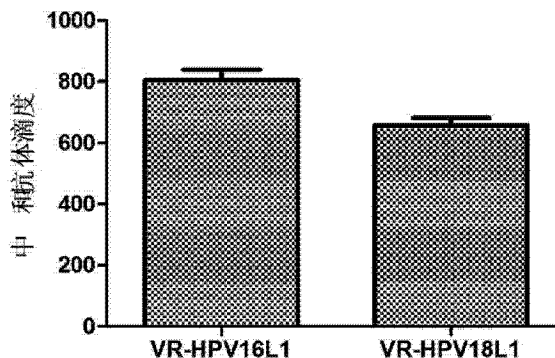
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

用于食管癌防治的 HPV16, 18L1 重组 DNA 疫苗

(57) 摘要

用于食管癌防治的 HPV16, 18L1 重组 DNA 疫苗, 属于生物医药技术领域。本发明提供一种优化型的编码 HPV16, 18 型主要衣壳蛋白 L1 的基因序列, 以及含有该序列的 pVR-HPV16, 18L1DNA 疫苗并提供了制备制备上述 pVR-HPV16, 18L1DNA 疫苗的方法。本发明提供的重组 HPV16, 18L1 的重组 DNA 疫苗还可用于制备治疗和预防 HPV 引起的疾病如宫颈癌及头颈癌的疫苗。



1. 一种密码子优化型的编码人乳头瘤病毒 16,18 型主要衣壳蛋白 L1 的基因,该基因具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。
2. 一种重组 DNA 质粒,该重组质粒携带有权利要求 1 所述的基因。
3. 制备权利要求 2 所述重组 HPV16,18L1DNA 疫苗的方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - (1) 通过用哺乳动物高频使用的密码子取代 HPV16,18L1 基因序列的密码子,得到密码子优化型 HPV16,18L1 基因;
 - (2) 将步骤(1)得到的密码子优化型 HPV16,18L1 基因克隆入载体 DNA 质粒,得到携带密码子优化型 HPV16,18L1 基因序列的重组 DNA 质粒。
4. 根据权利要求 3 的方法,其中所述的载体 DNA 质粒是质粒 VR-1012。
5. 根据权利要求 1 所述基因在制备用于防治 HPV 引起的疾病的药物或疫苗组合物中的用途。
6. 根据权利要求 5 所述用途,HPV 型选自 HPV6、11、16、18、30、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 或 68 型。
7. 根据权利要求 2 所述的重组 DNA 疫苗在制备用于预防和 / 或治疗 HPV 引起的疾病如食管癌的药物或疫苗组合物中的用途。
8. 根据权利要求 2 所述的重组 DNA 疫苗在制备用于预防和 / 或治疗 HPV 引起的其他疾病如宫颈癌、头颈癌的药物或疫苗组合物中的用途。

用于食管癌防治的 HPV16,18L1 重组 DNA 疫苗

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药领域。本发明涉及一种含密码子优化型 HPV16,18L1 基因的肿瘤 DNA 疫苗的制作方法。

背景技术

[0002] 子宫颈癌是全球第二大妇科恶性肿瘤,仅次于乳腺癌,全球有 50 万左右新发宫颈癌病例,约有 20 万人死于宫颈癌,其中 90% 以上来自发展中国家。死亡率为各类妇科肿瘤之首。我国每年新发现的病例为 13.15 万,约占全球总数的 28.8%。20 世纪 70 年代,ZurHausen 提出 HPV 是宫颈癌的病毒学成因,之后国内外学者就两者之间的关系进行了大量研究并提出 90% 以上的宫颈癌是由于 HPV 感染引起,国际癌症研究协会(IARC)发表的研究显示超过 2/3 的子宫颈癌病例与 HPV16 型(51%)或 HPV18 型(16.2%)感染有关。

[0003] 食管癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,全球每年新发病例约 40 万,我国约占一半左右,其中淮河流域和太行山地区属于食管癌的高发地区。1982 年 syrjane 的研究表明 HPV 和食管鳞癌之间存在相关性,之后的不少研究也证实了这一观点(Shen ZY, Xu LY, Li EM, et al. The multistage process of carcinogenesis in human esophageal epithelial cells induced by human papillomavirus. *Oncol Rep*, 2004, 11:647-54.)其中曲鹏,李劲涛的研究也表明 HPV 感染可能是食管鳞癌的病毒学诱因,结果显示标本 HPV 感染率为 82.6%,其中 HPV16 型感染率 34.8%, HPV18 型感染率 34.8%。(安阳地区不同食管鳞癌标本 HPV 感染率的比较研究,曲鹏,李劲涛)

[0004] 人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)是一种在自然界广泛存在的嗜上皮性病毒,属于乳多空病毒科的乳头瘤病毒属的无包膜闭环双链 DNA 病毒。其基因组分为 E 区, L 区和 URR 区, E 区中编码的 E6 和 E7 是 HPV 的主要致癌蛋白,主要通过与其降解或引起转录因子释放引起细胞无限增殖并向恶性转化。因为 E6, E7 蛋白在细胞周期中的重要作用,因此治疗性疫苗的研究多集中在 E6, E7 基因。但是也正是由于 E6, E7 整合宿主基因组并能诱导癌变,安全性不能得到保证。

[0005] HPV 基因组 L 区的 L1 作为 HPV 的主要衣壳蛋白能够单独或与次要衣壳蛋白 L2 共同在体外自行组装成 VLPs。已经上市并广为接种的两种针对 HPV 预防性疫苗, Merck 公司的 HPV6、11、16、18 四价 VLP Gardasil 疫苗和 GSK 公司研制的 HPV16、18 双价 VLP Cervarix 疫苗,都是由 HPV L1 蛋白组装成的 VLPs。其作用机理是以 VLP 三作为靶抗原诱导机体产生特异性中和抗体达到预防相应型别 HPV 的感染。

[0006] DNA 疫苗是指将编码某种蛋白质抗原的重组真核表达载体直接注射到动物体内,使外源基因在活体内表达,产生的抗原激活机体的免疫系统,从而诱导特异性的体液免疫和细胞免疫应答。DNA 疫苗容易制备,稳定性好,并且不会产生针对 DNA 载体的中和抗体,可以重复免疫,有研究证明,编码 HPV16,18 型别 E6, E7 蛋白的 DNA 疫苗在临床实验中对宫颈上皮内瘤变患者具有明显的治疗效果。(GARCIA F, PETRY K U, MUDERSPACH L, et al. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia:a

randomized controlled trial[J]. *Obstetrics&Gynecology*. 2004, 103 (2) :317)

[0007] L1 基因无致癌性,且 L1 编码的蛋白能诱导产生较高的体液免疫和细胞免疫效果,因此可以开发用于食管癌和宫颈癌防治的基于 HPV16,18 的 DNA 疫苗。

发明内容

[0008] 本发明提供了一种密码子优化型的编码 HPV16,18 主要衣壳蛋白 L1 的基因序列以及一种含有上述优化型基因的重组 DNA 疫苗。

[0009] 一种密码子优化型的编码人乳头瘤病毒 16,18 型(HPV16,18)主要衣壳蛋白 L1 的基因,该基因具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。

[0010] 一种含有上述优化型基因的重组 DNA 疫苗携带有上述的基因。

[0011] 一种含有上述优化型基因的重组 DNA 疫苗通过以下步骤实现:

[0012] (1) 通过用哺乳动物高频使用的密码子取代 HPV16,18L1 基因序列的密码子,得到密码子优化型 HPV16,18L1 基因;

[0013] (2) 将步骤(1)得到的密码子优化型 HPV16,18L1 基因克隆入 VR-1020 质粒,得到携带密码子优化型 HPV16,18L1 基因序列的重组 DNA 疫苗;

[0014] (3)检测重组 DNA 疫苗的体外表达并使用 Qiagene endofree 大提试剂盒提取重组 DNA 质粒,采用初免-加强策略肌注 Balb/c 小鼠,检测免疫效果。

[0015] 本发明提供了一种密码子优化型的编码人乳头瘤病毒 16,18 型(HPV16,18)主要衣壳蛋白 L1 的基因(mod. HPV16,18L1),该基因是在不改变 HPV16,18 主要衣壳蛋白 L1 氨基酸序列的条件下,用哺乳动物高频使用的密码子取代 HPV16,18L1 基因序列的密码子得到的。

[0016] 本发明提供了一种密码子优化型 HPV16,18L1 基因重组 DNA 疫苗。所述优化的编码乳头瘤病毒 16,18 型(HPV16,18)主要衣壳蛋白 L1 的基因(mod. HPV16,18L1)的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,并将其构建至 DNA 载体上得到重组 DNA 疫苗。将优化后的 HPV16,18L1 基因重组 DNA 疫苗转染细胞进行蛋白表达,结果发现:优化后的 HPV16,18L1 基因(mod. HPV16,18L1)能够高效地表达蛋白。

[0017] 在一个优选的实施方案中,其中所述的 DNA 载体 VR-1012 质粒。

[0018] 在一个优选的实施方案中,其中所述的体外表达细胞是 HEK293 细胞。

[0019] 另一方面,本发明还提供了所述优化型的编码乳头瘤病毒 16,18 型(HPV16,18)主要衣壳蛋白 L1 的基因在制备用于防治 HPV 引起的疾病的药物或疫苗组合物中的用途,其中所述 HPV 优选为 HPV16,18 型。

[0020] 另一方面,本发明还提供了本发明所述的重组 HPV16,18L1DNA 疫苗在制备用于预防和/或治疗 HPV 引起的疾病如宫颈癌、食管癌及头颈癌的药物或疫苗组合物中的用途。

具体实施方式

[0021] 材料和方法

[0022] 大肠杆菌 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司,DNA A-Tailing Kit、pMD16,18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。HEK293 细胞由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所贾润清老师提供。含 pVR-HPV16,18L1 质粒的甘油菌以及含密码子优化型 HPV16,

18L1 基因的质粒 pMK-RQ 由周玉柏老师提供。限制性内切酶 Bgl II 和 Sal I 购自 NewEngland Biology 公司, T4DNA 连接酶、DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。普通 DNA 纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、pfu DNA 聚合酶、dNTP 均购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒提取试剂盒(Midi)、去内毒素质粒提取试剂盒(Maxi、Mega) 购自 QIAGEN 公司。预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司。脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。DMEM 培养基、OptiMEM I 培养基、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、青链霉素双抗购自 Gibco 公司。小鼠抗 HPV16, 18L1 单抗购自 Abcam 公司, 小鼠抗 β -actin 单抗购自北京中杉金桥生物技术公司。羊抗小鼠 IgG 抗体(Anti-MOUSE IgG(H&L) (GOAT) Antibody IRDye700DX) 购自 Rockland 公司。其它分析纯试剂由本实验室提供。脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。QuickShuttle 转染试剂购自北京康碧泉生物科技有限公司。DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、Quick Spot 小鼠 IFN- γ ELISPOT 预包被试剂盒、EZ-SepTM Mouse1X 易得小鼠淋巴细胞分离液购自深圳达科为生物技术有限公司。其它分析纯试剂由本实验室提供。实验中设计的多肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成。实验所需引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

[0023] 本发明所涉及的分子生物学和免疫学等相关技术如核酸操作技术, 蛋白质定性和定量分析等在科学文献中都已充分描述(如参见 J·萨姆布鲁克 E·F·弗里奇 T·曼尼要蒂斯, 分子克隆实验指南(第二版))。

[0024] 实施例 1 重组 VR-HPV16, 18L1DNA 质粒的构建

[0025] 1. 1PCR 扩增 HPV16, 18L1-pVR 基因片段

[0026] 1. 1. 1 以含密码子优化的 HPV18L1 基因的 pMK-RQ 为模板, 以合成序列为引物进行 PCR 扩增 HPV16, 18L1-pVR 基因片段。PCR 完成后取 1 μ L 反应溶液进行 DNA 凝胶(1%)电泳检测。检测得到较好结果后回收 PCR 产物。

[0027] 1. 1. 2HPV16L1 基因序列的构建: 以含 HPV16L1 基因的 PUC-HPV16L1 质粒为模板, 以合成序列为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系是: 模板质粒 1 μ l, 上下游引物各 1 μ l, 10 \times Pfu Buffer10 μ l, dNTP8 μ l, Pfu2 μ l, ddH₂O77 μ l, 总体系 100 μ l。经过 30 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s) 获得 HPV16L1 基因序列, PCR 反应产物通过切胶回收进行纯化。

[0028] 1. 2HPV18L1-pVR 基因片段与 T 载体的连接将 PCR 扩增得到的 HPV16, 18L1-pVR 基因片段连接到 pMD16, 18-T 载体上以保存并确保较高的酶切效率。由于 pfu 酶不能在扩增产物的 3' 末端加上 A, 需要首先使用 DNA A-Tailing Kit 把 PCR 产物 3' 末端加 A。按说明书取适量的 PCR 产物, 加入 10 \times A-Tailing Buffer5 μ L, dNTP4 μ L, A-Tailing Enzyme0.5 μ L, 补水至 50 μ L, 置于 PCR 仪 72 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟, 然后冰上静置 1~2 分钟。然后取适量的上述 3' 末端加 A 的 PCR 产物, 加入 pMD16, 18-TVector1 μ L, 补水至 5 μ L, 然后加入 5 μ L Solution I, 16 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。

[0029] 1. 3T 载体连接产物的转化将 1.2 中全部的连接产物(10 μ L) 加入至 50 μ L DH5 α 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。42 $^{\circ}$ C 加热 90 秒后, 再在冰中放置 2~3 分钟。然后加入 400 μ L LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 45 分钟。取 100 μ L 已转化的感受态细胞, 用弯头玻棒轻轻涂到含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂平板培养基上。平板上液体被吸收后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 12~16h。

[0030] 1.4 小提并双酶切重组 T 载体和 pVR 质粒挑取平板上的白色菌落,接种到 4mLAmp 抗性的 LB 培养基中,37℃ 剧烈振荡培养过夜。按小提试剂盒说明书步骤小提质粒,然后使用限制性内切酶 Bgl II 和 Sal I 对重组 T 载体和 pVR 质粒进行双酶切(HPV18 型别)。对于 HPV16 型别使用 Bgl I 和 Sal I 对表达载体 VR-1012 进行双酶切。酶切体系:VR-1012 载体质粒 20 μ l, BSA0.5 μ l, 10×buffer45 μ l, 内切酶 Bgl I 2 μ l, Sal I 2 μ l, ddH₂O.5 μ l, 总的酶切体系 50 μ l, 37℃ 消化 3-4h。用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的条带。取 1 μ L 回收的 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测回收效果。

[0031] 1.5 HPV16, 18L1 片段和 pVR 质粒的连接转化对于 HPV18 型别,连接体系为:适量的 2.2.1.4 中酶切回收的 HPV18L1 片段和 pVR 质粒, 10×T4Ligase buffer2 μ L, T4 连接酶 1.5 μ L, 补水至 20 μ L。16℃ 连接过夜。对于 HPV16 型别连接体系为 HPV16L17 μ l, VR-10121 μ l, 10× 连接 buffer1 μ l, T4 连接酶 1 μ l。16℃ 连接过夜。将全部的连接产物(20 μ L) 加入至 50 μ L DH5 α 感受态细胞中,冰中放置 30 分钟。42℃ 加热 90 秒后,再在冰中放置 2 ~ 3 分钟。然后加入 400 μ L LB 培养基,37℃ 振荡培养 45 分钟。取 100 μ L 已转化的感受态细胞,用弯头玻棒轻轻涂到含有 Kana 的 LB 琼脂平板培养基上。平板上液体被吸收后置于 37℃ 恒温箱培养 12 ~ 16h。

[0032] 1.6 小提并鉴定重组质粒挑取平板上的单菌落接种到 4mL Kana 抗性的 LB 培养基中,37℃ 剧烈振荡培养过夜。按小提试剂盒说明书步骤小提质粒,然后使用限制性内切酶 Bgl I 和 SalI 对 HPV16 型别 DNA-HPV16L1 和使用限制性内切酶 Bgl II 和 Sal I 对提取的重组型 DNA-HPV18L1 质粒, 双酶切鉴定。初步鉴定正确后送北京华大基因测序。测序结果正确的重组 pVR 质粒命名为 pVR-HPV16L1 和 pVR-HPV18L1。

[0033] 实施例 2pVR-HPV16, 18L1 体外表达的检测

[0034] 2.1 HEK293 细胞的培养培养 HEK293 细胞所用的培养基为含 10%FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基,培养条件为 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱。

[0035] 2.2 中提的质粒转染细胞

[0036] (1) 转染前一天,胰酶消化 293 细胞并计数,将细胞转至六孔板,控制密度使其在转染日密度接近 90%。细胞铺板在 2mL 含血清,不含抗生素的正常生长的培养基中。

[0037] (2) 对于每孔细胞,使用 250 μ L OPTI-MEM I 培养基稀释 4 μ g 质粒(pVR-HPV16, 18L1)。Lipofectamine2000 试剂用前混匀,用 250 μ LOPTI-MEM I 培养基稀释 10 μ L Lipofectamine2000。轻柔混匀,室温静置 5 分钟,然后同稀释的质粒混合,再室温静置 20min。

[0038] (3) 直接将复合物(500 μ L) 逐滴加入到每孔中,前后(或左右) 摇动培养板,轻轻混匀。放入 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱。4 ~ 6 小时后换液为正常生长的培养基。

[0039] 2.3 Western Blot 检测 HPV16, 18L1 蛋白

[0040] (1) 转染 48h 后,弃去培养基,用 PBS 洗一遍细胞,每孔细胞加入 80 μ L 的细胞裂解液(50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 1%Triton X-100, 100 μ g/mL PMSF(临用前加入)), 用移液器吹打或用细胞刮刮下细胞,裂解后的细胞收集到 1.5mL Eppendorf 管中,12000r/min 离心 10min。

[0041] (2) 取上清加 1/4 体积的 5× 电泳上样缓冲液,沸水中煮 5 ~ 10min,取 20 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳(积层胶为 5%, 分离胶为 10%), 110V 恒压电泳;电泳结束后,采用半干转

法将蛋白转至硝酸纤维素(NC)膜上;将NC膜置于含有5%脱脂奶粉的PBS中37℃慢慢摇动封闭1h;弃封闭液,加入1:1000的小鼠抗HPV16,18L1单克隆抗体(8.F.324)4℃冰箱过夜;以含有0.05%Tween-20的PBS洗膜3次,每次10min;加入1:5000稀释的羊抗小鼠IgG抗体(Anti-MOUSE IgG(H&L)(GOAT)Antibody IRDye700DX)室温摇动孵育45min;用含有0.05%Tween-20的PBS洗膜3次,每次10min;将膜置于PBST中,然后用Odyssey远红外影像分析仪检测HPV16,18L1蛋白,(结果参见图1,2)。

[0042] 实施例3重组DNA疫苗pVR-HPV16,18L1免疫小鼠实验

[0043] 3.1 免疫小鼠的准备及免疫计划

[0044] 从商业途径获得的20只4~6周龄的SPF级的健康雌BALB/cH-2Kd小鼠随机分为3组,每组10只,在第0和3周大腿肌肉注射免疫两次,末次加强免疫后一周检测免疫反应。具体免疫内容和剂量见表1。

[0045] 表1 小鼠免疫分组和剂量

组别	剂量	Primer (DNA, Day 0)	Boost (DAN, Week 3)
对照组	100ul	PBS	PBS
[0046] pVR-HPV 18 L1	100 μg	pVR-18 L1	pVR-18 L1
pVR-HPV 16L1	100 μg	pVR-16 L1	pVR-16 L1

[0047] 3.2 免疫小鼠中HPV16,18L1体液免疫反应的检测

[0048] 末次加强免疫后一周(第28天)采集小鼠的静脉血,分离血清。按文献报道的方法(Buck, C. B., D. V. Pastrana, D. R. Lowy, et, al. J. Virol. 2004, 78:751 - 757.)制备HPV16,18假病毒颗粒。

[0049] (1) 测定假病毒滴度。1. 细胞的技术及上样。取一瓶生长良好细胞融合率达80%左右的293FT细胞,弃去原液,PBS冲洗2遍。1ml0.05%胰酶消化液到培养瓶细胞面的对侧,翻转培养瓶平放以确保胰酶完全覆盖细胞层,消化2-3分钟。加入中和DMEM培养液5ml终止消化,用吸管反复吹打培养细胞面十次,将瓶壁的细胞冲下来,再用吸管反复吹打培养液十五次,使细胞分散均匀。将培养液转移至15ml离心管,200g离心。弃上清,5mlDMEM重悬。细胞计数,约为 2×10^7 。细胞稀释至密度为 3×10^5 cells/ml。用排枪将细胞加入96孔培养板中(100ul/孔)。(注意:每次加样前轻轻混匀细胞),将培养板放入细胞培养箱,37℃过夜。取一块96孔细胞培养板用中和DMEM稀释假病毒(100ul/孔)。2. 假病毒滴定。阳性对照加入肝素钠(100mg/ml 肝素钠 2ul/孔)。将上述步骤中的假病毒及肝素钠加入含有293FT细胞的96孔培养板中,将培养板放入细胞培养箱中,37℃培养72h。(注意:不要摇动,轻轻放入培养箱中)。将0.05%chaps加入96孔酶标板中(20ul/孔),均匀覆盖孔底。加入培养72h后的上清液(40ul/孔),65℃,30min灭活碱性磷酸酯酶。加入coloring substrate (200ul/孔),室温放置2-3小时。(注意:此步骤要严格避光)。用酶标仪测定A405nm。根据测定结果选择合适的假病毒浓度用于下游的血清抗体中和试验。

[0050] (2) 测定中和抗体滴度。稀释293FT细胞到 3×10^5 /mL,按100uL/孔铺于96孔细胞培养板中,37℃培养3h,按1:20稀释血清,按一定比例稀释SEAP-PsV16,18,将20ul稀释血清加入到80ul稀释PSV中,冰浴1h,将混合液加入293FT细胞中,继续培养72h,未加入血清

的孔作为阴性对照,每个标本及阴性对照为双复孔,在酶标板的孔中先加入 0.05%CHAPS 在 PBS, 20 μ l/孔。加入细胞上清液 40 μ l/孔, 65 $^{\circ}$ C, 30min 灭活内源性碱性磷酸酶,加入 200 μ l PNP 反应底物 (20ml 二乙醇胺 Mg+Zn 溶液, 一片 PNP), 室温避光 2-4 小时, Bio-Rad550 型酶标仪测定 405nm 波长下的 OD 值。以 A405nm 值低于阴性对照 50% 判为阳性。pVR-HPV16L1 组和 pVR-HPV18L1 产生的抗体效价分别达到 800 及 640, 表明重组 DNA 疫苗 pVR-HPV16L1 和 pVR-HPV18L1 能在 BALB/c 小鼠体内诱导较高的体液免疫应答(参见图 3)。

[0051] 3.3 免疫小鼠中 PV16, 18L1 细胞免疫反应的检测

[0052] 加强免疫一周后(第 28 天),使用颈椎脱臼法处死小鼠并取脾脏,用淋巴细胞分离液分离小鼠脾淋巴细胞,采用酶联免疫斑点 (ELISPOT) 方法检测分泌 IFN- γ (γ -干扰素) 的 T 淋巴细胞。取 50 μ l 2×10^5 /ml 的小鼠脾淋巴细胞和等量的 8 μ g/ml 多肽(使用因特网 http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/ 上的 BIMAS 肽结合软件鉴定预测的 T 细胞识别肽 (H2-Kd 限制) 并经常规合成技术合成) 加入已包被抗小鼠 IFN- γ 抗体并封闭过的 ELISPOT 板中,每只小鼠做 3 复孔,另外,每只小鼠的阴性对照孔只加等量的细胞不加多肽,阳性对照孔加入细胞和终浓度为 20 μ g/ml 的植物凝集素 (PHA)。具体方法如下:

[0053] (1) 分离细胞。处死小鼠,浸入 75% 的乙醇中浸泡 1-2 分钟,镊子摘下小鼠脾脏,培养皿中放入 4-5ml 淋巴细胞分离液:使用前摇匀淋巴细胞分离液,研磨时只能点压,不能画圈研磨。轻轻研磨每一只脾脏时间最好控制 5 分钟之内,做完一只后都要拧上活塞,以防止液体挥发导致密度不均,不易成层。研磨液立即转移到离心管中,页面上覆盖上大约 200-500 μ l 的易养培养基(在加细胞培养基时候注意沿管壁加入)每研磨一只小鼠,立即把脾细胞悬液从培养皿转入离心管中,注意盖严管盖。在所有的小鼠脾脏处理完后,统一再加 1640 覆盖层。800g 离心 30 分钟,应当控制降速的节奏。吸出淋巴细胞层至 15ml 管(吸取分离的淋巴细胞层时注意尽量多吸上层的细胞),缓慢加入 10ml 1640 培养基,盖上盖后,颠倒 6-10 次,250g 离心 10 分钟。弃上清,加入 1ml Lympho-SpotTM 无血清培养基重悬,细胞计数。

[0054] (2) 细胞上样及孵育。1. 计数及计算:将计数板及盖片擦拭干净,并将盖片盖在计数板。将细胞悬液吸出少许,滴加在盖片边缘,使悬液充满盖片和计数板之间,静止 3min,注意盖片下不要有气泡,也不能让悬液流入旁边槽中,计算板四大格细胞总数,压线细胞只计左侧和上方的。然后按公式计算:细胞数 /ml = 四大格细胞总数 /4 $\times 10^4$ (注意:镜下偶见有两个以上细胞组成的细胞团,应按单个细胞计算,若细胞团占 10% 以上,说明分散不好,需重新制备细胞悬液)。大概的细胞数量约为 $1-10 \times 10^7$ 个。稀释时可先将细胞稀释到 10^7 /ml,再取 300 μ l (此时的细胞量为 3×10^6) 稀释到 1ml (加入 700 μ l 1640 培养基即可),因此上样量为 3×10^6 /ml。2. 预包被板的活化:200 μ l/well EZ-CultureTM 无血清培养基,室温静置 5-10min 后将其扣出。3. 加入细胞悬液,将调整好浓度的细胞悬液加入各实验孔,100 μ l/well 3×10^5 cells/well。阳性对照为 20 万。加入刺激物:conA 或 PHA 10 μ l/well。加入按照网站预测合成的多肽刺激物(用 Lympho-SpotTM 无血清培养基配成终浓度为 8 μ g/ml, 10 μ l/well) 到实验孔。加完刺激物后不要再拍击 ELISPOT 板。3. 孵育:所有样品和刺激物加完后,盖好板盖。放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养 16-20hr。当加完所有的样品之后,盖上班盖,放入二氧化碳培养箱,37 $^{\circ}$ C 培养 18-24h。碰撞会引起细胞移位,造成斑点模糊、拖尾。在整个培养过程中应避免移动、碰撞培养板,并尽量减少开关培养箱的次数。

[0055] (3) 细胞培养后的显色操作(不再需要无菌操作)

[0056] 倾倒孔内的细胞及培养基。每孔加入 200 μ L 冰冷的去离子水, 4 $^{\circ}$ C 10min (低渗法裂解细胞)。也可以将加了去离子水的板子放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 5min, 再转入 4 $^{\circ}$ C 冰箱 5min, 用以替代冰浴。为防结冰, 板子放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱的时间不要超过 5min。每孔用 200 μ L washingbuffer 洗涤 10 次。最后一次, 在吸水纸上扣干。按照试剂盒说明的浓度, 每孔加入 100 μ L 稀释好的生物素标记检测抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。每孔用 200 μ L PBST 洗涤 5 次。最后一次, 在吸水纸上扣干。按照试剂盒说明的浓度, 每孔加 100 μ L 稀释好的酶标亲和素, 37 $^{\circ}$ C 1 小时。每孔用 200 μ L PBST 洗涤 5 次。最后一次, 在吸水纸上扣干。按照试剂盒的说明, 解冻已配好的 AEC 显色液。每孔加入 100 μ L 的显色液, 室温静置 15-45min (在 20-25 $^{\circ}$ C, 显色 25min 较合适), 注意避光。(37 $^{\circ}$ C 避光静置 12-15min), 待斑点生长到适合的大小之后, 以去离子水洗涤 2 遍, 终止显色过程。将板倒扣在吸水纸上, 拍干细小的水珠, 之后取下保护层, 放在通风的地方, 室温静置 10-30min, 让膜自然晾干。注意不要将板放到烤箱内, 防止膜发脆、破裂。将 ELISPOT 板置于 Biosys Bioreader4000PRO 自动读板仪内, 调节好合适的参数, 斑点计数, 并记录斑点的各种参数, 做统计分析。

[0057] 结果显示第 2, 3 组小鼠脾淋巴细胞在相应的 HPV16, 18L1 合成多肽的刺激下分泌 IFN- γ 的细胞数量明显地高于第一组对照组, HPV16 型别中 1×10^6 的脾淋巴细胞中的斑点数达到 2070 (参见图 4), HPV18 型别中 1×10^6 的脾淋巴细胞中的斑点数达到 500 以上(参见图 5), 表明重组 pVR-HPV16, 18L1 疫苗能在 BALB/C H-2Kd 小鼠体内诱导较高的细胞免疫应答。

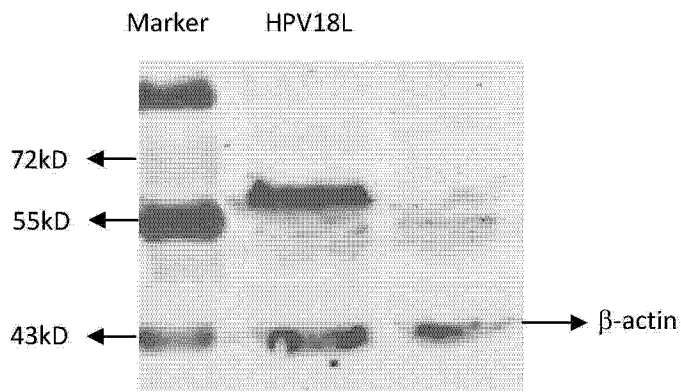


图 1

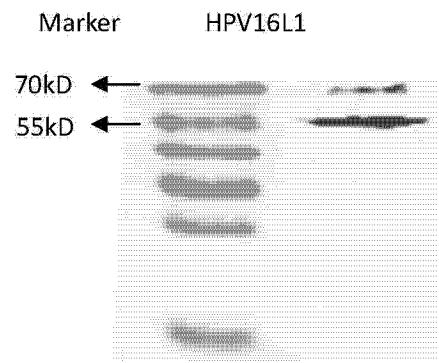


图 2

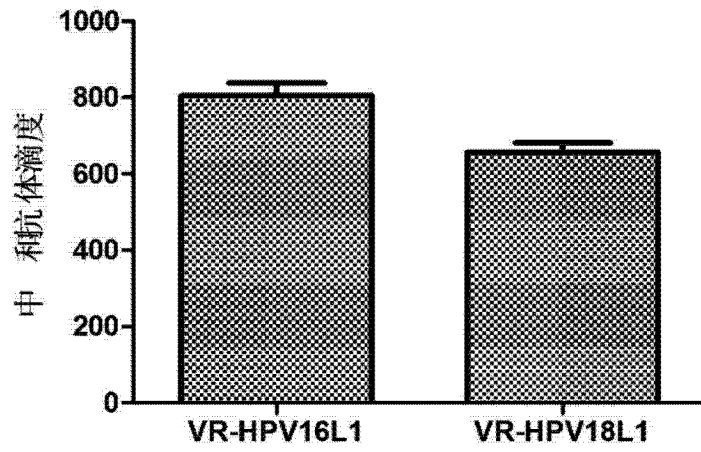


图 3

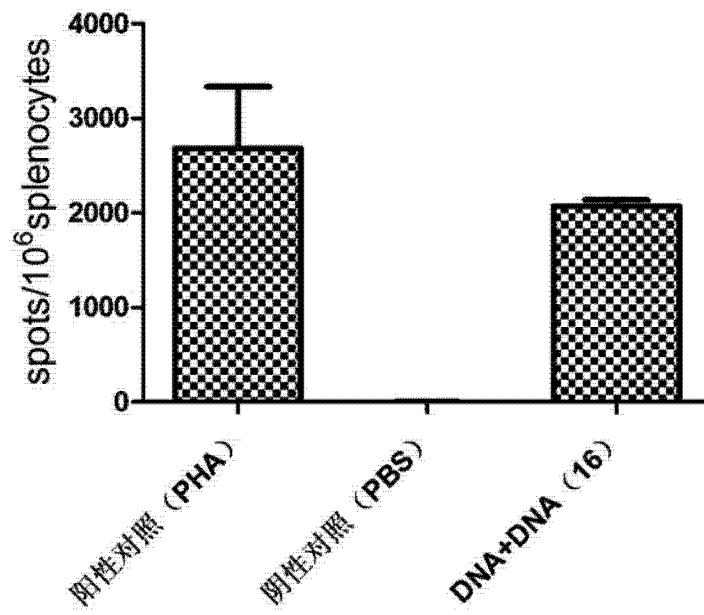


图 4

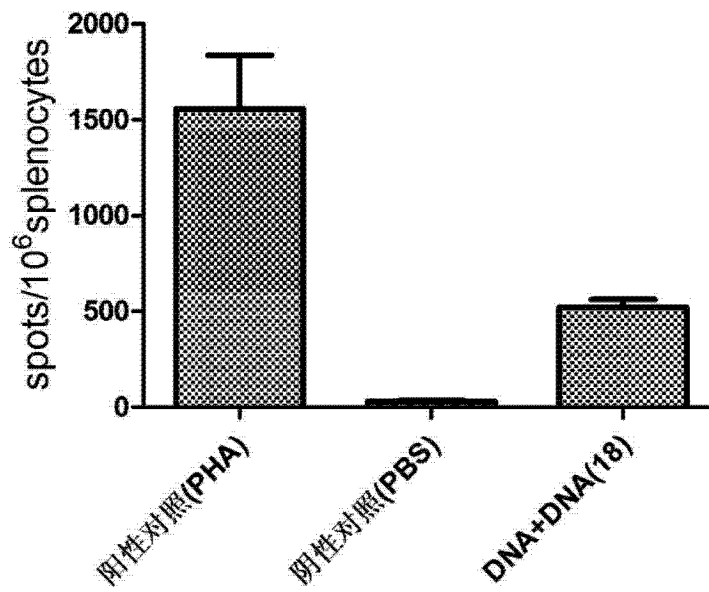


图 5