



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104140980 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 12

(21) 申请号 201410035933. 4

(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 刘海庭 方军

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 15/864 (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8页

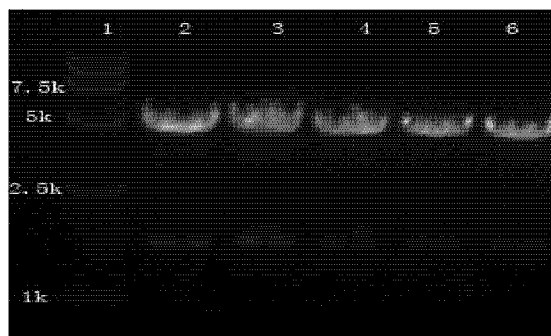
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

HPV18 的重组腺相关病毒疫苗及其制备方法

(57) 摘要

HPV18 的重组腺相关病毒疫苗及其制备方法属于生物医药技术领域。本发明提供一种优化型的编码 HPV18 型 (HPV18) 主要衣壳蛋白 L1 的基因序列, 以及含有其的 2/1 型重组腺相关病毒疫苗并提供了制备上述重组腺相关病毒的方法。本发明提供的重组 HPV18L1 的 2/1 型重组腺相关病毒疫苗可用于制备治疗和预防食管癌及宫颈癌的药物。



1. HPV18 的 2/1 型重组腺相关病毒,其特征在于,所述病毒含有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。

2. 一种制备权利要求 1 所述 2/1 型重组腺相关病毒的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)将 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列克隆到重组腺相关病毒穿梭质粒中,得到重组腺相关病毒穿梭质粒;

(2)用步骤(1)制备的重组腺相关穿梭质粒和 pHelper 质粒、P5E18RXC1 质粒共转染腺相关病毒包装细胞,得到含有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的 2/1 型重组腺相关病毒。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述重组腺相关病毒穿梭质粒是质粒 pAAV-MCS。

4. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述重组腺相关病毒包装细胞是 293ft 细胞。

5. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,三质粒采用 quickshuttle 转染试剂按照摩尔比 1:1:1 的比值进行三质粒共转染。

6. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述疫苗的成分为权利要求 1 所述的 2/1 型重组腺相关病毒。

7. 根据权利要求 1 所述基因在制备用于防治 HPV 引起的子宫颈癌的药物或疫苗组合物中的用途。

8. 根据权利要求 1 所述基因在制备用于防治 HPV 引起的食管癌的药物或疫苗组合物中的用途。

9. 根据权利要求 2 所述的重组腺相关病毒疫苗在制备用于预防和 / 或治疗宫颈癌药物或疫苗组合物中的用途。

10. 根据权利要求 2 所述的重组腺相关病毒疫苗在制备用于预防和 / 或治疗食管癌方面的药物或疫苗组合物中的用途。

HPV18 的重组腺相关病毒疫苗及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域。本发明涉及一种含密码子优化型 HPV18L1 基因的 2/1 型重组腺相关病毒疫苗及其制备方法。

背景技术

[0002] 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。20 世纪 70 年代, Zur Hausen 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 的宫颈癌病例与 HPV16 型(51%)或 HPV18 型(16.2%)感染有关。

[0003] 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] 全球范围内宫颈癌是第二大常见的妇科恶性肿瘤,每年约有 50 万新增子宫颈癌病例,28 万的死亡病例,我国每年新增宫颈癌病例约 13.5 万,占全球发病数量的 1 / 3,约 8 万人死亡。

[0005] 食管癌是常见的消化道肿瘤,全世界每年约有 30 万人死于食管癌。其发病率和死亡率各国差异很大。我国是世界上食管癌高发地区之一,每年平均病死约 15 万人。男多于女,发病年龄多在 40 岁以上。

[0006] 根据 HPV 与良性和恶性肿瘤的相关度,将 HPV 病毒分为低危型和高危型两种。其中低危型包括 HPV6、11、40、42、43、44、54、61、70、72 和 81 等,高危型包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 等。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。

[0007] AAV 属细小病毒科,为一缺陷病毒,是正链或负链单链 DNA 病毒,外包二十面体衣壳蛋白,病毒颗粒的直径在 20 ~ 26nm 之间。AAV 的复制依赖于辅助病毒(helper virus),如腺病毒或疱疹病毒。野生型 AAV2(wtAAV2)基因组为线性单链 DNA,大小约 4.7kb。两末端各含一个倒置末端重复序列(inverted terminal repeat, ITR),中间含有 rep 和 cap 基因。Xiao 等(1998)将腺病毒上起辅助功能的基因全部构建到一个新的质粒上,由质粒代替腺病毒向 rAAV2 提供辅助功能,从而构建了重组 II 型 AAV 载体(rAAV2),它具有长时程有效表

达外源基因、无致病性、免疫原性弱和基因定点整合等多项优点。重组 2/1 型 AAV(rAAV2/1) 是近年来出现的新型载体, 采用 AAV2 的 ITR, 而仅将 AAV2 的外壳蛋白基因置换成 AAV1 的外壳蛋白基因, 它在保持 II 型 AAV 载体高效表达外源基因、高安全性等优点的同时提供了更好的肌纤维细胞嗜性, 是目前基因治疗领域中倍受瞩目的载体之一。

[0008] HPV18L1 基因相对 E6,E7 癌基因而言更安全, 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, 而 2/1 型重组腺相关病毒(rAAV2/1) 也具有长时程有效表达外源基因、无致病性等有点, 因此可以开发制备防治食管癌和宫颈癌的基于 HPV18L1 的重组腺相关病毒疫苗。

发明内容

[0009] 本发明提供了一种密码子优化型的编码 HPV18 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 2/1 型重组腺相关病毒(rAAV2/1)。

[0010] 一种制备所述 2/1 型重组腺相关病毒(rAAV2/1) 的方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

[0011] (1) 将 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列克隆到重组腺相关病毒穿梭质粒中, 得到重组腺相关病毒穿梭质粒;

[0012] (2) 用步骤(1) 制备的重组腺相关穿梭质粒和 pHelper 质粒、P5E18RXC1 质粒共转染腺相关病毒包装细胞, 得到含有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的 2/1 型重组腺相关病毒(rAAV2/1)。

[0013] 进一步, 所述重组腺相关病毒穿梭质粒是质粒 pAAV-MCS。

[0014] 进一步, 所述重组腺相关病毒包装细胞是 293ft 细胞。

[0015] 进一步, 三质粒采用 quickshuttle 转染试剂按照摩尔比 1:1:1 的比值进行三质粒共转染。

[0016] 进一步, 所述疫苗的成分为所述的 2/1 型重组腺相关病毒。

[0017] 进一步包括, 所述基因在制备用于防治 HPV 引起的子宫颈癌的药物或疫苗组合物中的用途。

[0018] 进一步包括, 所述基因在制备用于防治 HPV 引起的食管癌的药物或疫苗组合物中的用途。

[0019] 进一步包括, 所述重组腺相关病毒疫苗在制备用于预防和 / 或治疗宫颈癌药物或疫苗组合物中的用途。

[0020] 进一步包括, 所述重组腺相关病毒疫苗在制备用于预防和 / 或治疗食管癌方面的药物或疫苗组合物中的用途。

[0021] 本发明更进一步提供一种 HPV18 的 2/1 型重组腺相关病毒疫苗, 其有效成分为上述 2/1 型重组腺相关病毒。

[0022] 本发明提供的 HPV18 的 2/1 型重组腺相关病毒可用于制备治疗和预防子宫颈癌和食管癌的药物。

[0023] 本发明实现的技术效果如下:

[0024] 本发明提供的 HPV18 的 2/1 型重组腺相关病毒, 用于制备 HPV18 的 2/1 型重组腺相关病毒疫苗, 产生中和抗体的滴度明显提高, 细胞免疫效果也显著加强。

附图说明

- [0025] 图 1. AAV-MCS-HPV18L1 重组质粒 HindIII, EorI I 双酶切电泳
- [0026] 1. DNAMarker12000
- [0027] 2. MCS-HPV8L1 质粒 1
- [0028] 3. MCS-HPV8L1 质粒 2
- [0029] 4. MCS-HPV8L1 质粒 3
- [0030] 5. MCS-HPV8L1 质粒 4
- [0031] 6. MCS-HPV8L1 质粒 5
- [0032] 图 2. 腺相关病毒颗粒的电镜图
- [0033] 图 3. rAAV2/1-HPV18L1 疫苗诱导的体液免疫
- [0034] 图 4. rAAV2/1-HPV18L1 疫苗在 Balb/c 小鼠中诱导的细胞免疫

具体实施方式

[0035] 材料和方法

[0036] 大肠杆菌 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司, DNA A-Tailing Kit、pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。HEK293ft 细胞由北京工业大学生命学院病毒药理室王小利老师提供。含密码子优化型 HPV18L1 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、pfuDNA 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、OptiMEMI 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 HPV18L1 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, 序列如下:

[0037] MCSF :5-ATAAGAATTCATGGCTCTGTGGCGGCCAG-3'

[0038] MCSR :5-ATATAAGCTTTCACCTGCGGGCTCTCACGC-3'

[0039] 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))。

[0040] 实施例 1 重组 pAAV-HPV18L1 质粒的构建

[0041] 1. 1PCR 扩增 HPV18L1 基因片段以含密码子优化的 HPV18L1 基因的 pMK-RQ 为模板,

MCSF 为上游引物, MCSR 为下游引物 PCR 扩增 HPV18L1 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。

[0042] 1.2 小提并双酶切重组载体和 HPV18L1 质粒挑取冻存的 pAAV-MCS 菌, 接种到 4mL Amp 抗性的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 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 Ecor1I 和 HindIII 对 pAAV-MCS 质粒和 HPV18L1 基因片段进行双酶切。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。

[0043] 1.3 HPV18L1 片段和 pAAV-MCS 质粒的连接转化

[0044] 连接体系为: 适量的 1.2 中酶切回收的 HPV18L1 片段和 pVR 质粒, 10 \times T4Ligase buffer 2.5 μ L, T4 连接酶 1 μ L, 补水至 20 μ L。16 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ 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 Kana 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。

[0045] 1.4 小提并鉴定重组质粒挑取平板上的单菌落接种到 4mL 氨苄抗性的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 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 Ecor1I 和 HindIII 对提取的质粒进行酶切鉴定, 结果如图 1 所示, 在相应的条带上有 pAAV-MCS 和 HPV18L1 片段。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质粒命名为 pAAV-HPV18L1。

[0046] 实验例 2: 重组腺相关病毒 rAAV2/1-HPV18L1 的制备, 纯化, 病毒滴度分析和电镜观察

[0047] (1) 重组腺相关病毒穿梭质粒 pAAV-HPV18L1 和辅助质粒的制备

[0048] 使用 QIAGEN Plasmid Giga Kits 质粒大量提取试剂盒分别提取重组腺相关病毒辅助质粒 pHelper、P5E18RXC1 及重组腺相关病毒穿梭质粒 pAAV-HPV18L1。具体实验操作步骤见 QIAGEN Plasmid Giga Kits 使用手册。

[0049] (2) 重组腺相关病毒的包装

[0050] 转染传代 293 细胞于 70 个 75cm² 培养瓶中, 根据 Quickshuttle 试剂盒操作说明进行转染: 48 μ g pHelper、16 μ g P5E18RXC1 及重组腺相关病毒穿梭质粒 16 μ g pAAV-HPV18L1 的量混匀质粒加到 500 μ l 的 NaCl 生理盐水中。取 160 μ l 的转染试剂加到 500 μ l 的 NaCl 生理盐水中。二者混匀之后加入到含有 15ml 细胞培养基的每瓶细胞中立传立转, 交叉混匀(DNA 和转染试剂 1:2 的比例), 置 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 继续培养。按此比例转染效果较好, 包装出的腺相关病毒较多。转染后 72 小时, 用细胞刮将细胞刮下, 800rpm 离心 5min, 弃上清, 用 2ml 无菌 PBS 重悬细胞沉淀; -80 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 3000rpm 取上清, 即为重组腺相关病毒粗制品, 命名为 rAAV2/1-HPV18L1, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0051] (3) 重组腺相关病毒的纯化

[0052] 使用 Biomiga Vira TrapTM AAV2Purification Maxiprep Kit 腺相关病毒纯化试剂盒对重组腺病毒进行纯化。准备腺相关病毒感染的细胞裂解液(6-8 \times T75 培养瓶/每根柱) 1. 对于转染的细胞贴壁, 用移液管吸去培养基, 使用细胞刮收集, 每瓶细胞用 3-5 毫升 PBS。将细胞收集到 50mL 离心管中。2. 在 350g, 10 分钟, 沉淀细胞。细胞沉淀在 -80 $^{\circ}$ C

下保存,或者立即进行下面的步骤。3. 离心管中加入 10mL (Binding Buffer) 结合缓冲液重悬细胞沉淀。确保在重悬后没有细胞团块。这对病毒颗粒的释放至关重要。4. 重悬后,加入 100 μ L 为 100 \times 核酸酶反应缓冲液(Nuclease Reaction Buffer)和 15 μ L 核酸酶(Nuclease)在 37 $^{\circ}$ C 温和震荡孵育 30-60min。5. 将离心管 600g 离心 15min,收集含 rAAV2/1-HPV18L1 上清液后用 0.45 μ m 的滤膜过滤上清液。6. 采用硅胶柱纯化的方法,平衡硅胶柱,将硅胶柱放置在 50mL 的离心管中,在 400 \times g 离心 1 分钟,使填料平整无气泡。将分离柱平置,拧开底部,让液体流出。先用 4ml ddH₂O 然后 8 毫升结合缓冲液((Binding Buffer))平衡柱。7. 将上清液加入纯化柱中,使上清液逐渐穿过纯化柱。收集滤出液,并重新加入该纯化柱中,使纯化柱中的病毒粒子能充分上样。洗掉纯化柱中的非特异性结合并洗脱 rAAV2/1-HPV18L1。8. 用 10ml 结合缓冲液洗柱,重复一次。上清液可以由自然流下或以 400g 离心 5 分钟。9. 用 4-6ml 洗脱缓冲液洗脱 rAAV2/1-HPV18L1。收集洗脱液,1ml 每管。收集的洗脱液使用脱盐柱在 5000rpm 离心 10min。纯化的病毒通过 0.22 μ m 的滤膜过滤。

[0053] (4) 重组腺相关病毒滴度的测定

[0054] 使用 CELL BIOLABS, INC QuickTiter™ AAV2Quantitation Kit 腺相关病毒滴度测定试剂盒对重组腺相关病毒进行滴度测定。通过测定腺相关病毒中 DNA 分子含量的原理,通过荧光染料发光值确定腺病毒含量。按照 1:2 比例建立标准样品曲线浓度从 10 微克/毫升,5 微克/毫升,2.5 微克/毫升,1.25 微克/毫升,0 微克/毫升,每个稀释度转移 10 μ L 至微孔板。加入 90 μ L CyQuant® GR 染料到含有 10 μ L 标准样品的 96 孔板。使用 480/520nm 波长设置荧光酶标仪读板,混合 13.5 μ L 纯化 rAAV2/1-HPV18L1 样品和 1.5 μ L QuickTiter 试剂盒中的 10 \times C 液,75 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时短暂离心收集管壁的液滴,室温孵育 20 分钟。通过混合 13.5 μ L 相同的纯化 rAAV2/1-HPV18L1 和 1.5 μ L 10 \times C 液准备未加热的对照样品。将 10 μ L 未加热组和实验组样品的混合物到 96 孔板中,各孔分别加入 90 μ L 的新鲜配制 1 \times CyQuant® GR 染料,用荧光酶标仪 480/520nm 波段读板。根据标准曲线及说明书中的公式 $Titer(GC/mL) = Dilution\ Factor \times AAV2-2DNA(ng) \times (3.6 \times 10^8 GC/ng) \times (15 \mu L / 13.5 \mu L) / 0.010 mL$ 计算 rAAV2/1-HPV18L1 滴度约为 $8.8 \times 10^{11} vg/ml$

[0055] (5) 重组腺相关病毒 rAAV2/1-HPV18L1 电镜观察:

[0056] 取 10 μ L 纯化的 rAAV2/1-HPV18L1 病毒悬液用 2% 磷钨酸复染 3min,在透射电镜下观察病毒样颗粒的形态。结果如图 2 所示,电镜下可见直径约 20nm 的病毒颗粒的存在。

[0057] 实验例 3:重组腺相关病毒 rAAV2/1-HPV18L1 免疫效果的初步研究

[0058] 3.1 免疫小鼠的准备及免疫计划

[0059] 从商业途径获得的 20 只 4~6 周龄的 SPF 级的健康雌 BALB/cH-2K^d 小鼠随机分为 2 组,每组 5 只,在第一周大腿肌肉注射免疫,免疫后一周检测免疫反应。具体免疫内容和剂量见表 1。

[0060] 表 1 小鼠免疫分组和剂量

组别	剂量	疫苗
对照组	100ul	PBS
[0061] rAAV2/1-HPV18 1	$1 \times 10^{11} \mu\text{g}$	rAAV2/1-HPV18 L1

[0062] 3.2 免疫小鼠中 HPV18L1 体液免疫反应的检测

[0063] 免疫后一周采集小鼠的静脉血,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。

(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。1ml 0.05% 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,5ml DMEM 重悬。细胞计数,约为 2×10^7 。细胞稀释至密度为 2×10^5 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。

[0064] (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 in PBS,20ul/孔。加入细胞上清液 40ul/孔,65℃,30min 灭活内源性碱性磷酸酶,加入 200ul 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。rAAV2/1-HPV18L1 产生的抗体效价达到 2560,表明重组腺相关病毒疫苗 rAAV2/1-HPV18L1 能在 BALB/c 小鼠体内诱导较高的体液免疫应答(参见图 2)。

[0065] 3.3 免疫小鼠中 HPV18L1 细胞免疫反应的检测

[0066] 加强免疫一周后,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 $50 \mu\text{l} \times 10^5$ /ml 的小鼠脾淋巴细胞和等量的 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $20 \mu\text{g/ml}$ 的植物凝集素 (PHA)。具体方法如下：

[0067] (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 μL 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-Spot™ 无血清培养基重悬，细胞计数。

[0068] (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 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 $10^7/\text{ml}$ ，再取 300 μl (此时的细胞量为 3×10^6) 稀释到 1ml (加入 700 μl 1640 培养基即可)，因此上样量为 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 。2. 预包被板的活化：200 $\mu\text{L}/\text{well}$ EZ-Culture™ 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ 3×10^5 cells/well。阳性对照为 10 万。加入刺激物：conA 或 PHA 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ 。加入按照网站预测合成的多肽刺激物(用 Lympho-Spot™ 无血清培养基配成终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，10 $\mu\text{L}/\text{well}$) 到实验孔。加完刺激物后不要再拍击 ELISPOT 板。4. 孵育：所有样品和刺激物加完后，盖好板盖。放入 37°C ，5% CO_2 培养箱培养 16-20hr。当加完所有的样品之后，盖上板盖，放入二氧化碳培养箱， 37°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。

[0069] (3) 细胞培养后的显色操作(不再需要无菌操作)

[0070] 倾倒孔内的细胞及培养基。每孔加入 200 μL 冰冷的去离子水， 4°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°C 冰箱 5min，再转入 4°C 冰箱 5min，用以替代冰浴。为防结冰，板子放入 -20°C 冰箱的时间不要超过 5min。每孔用 200 μL washing buffer 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 μL 稀释好的生物素标记检测抗体， 37°C 孵育 1h。每孔用 200 μL 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 μL 稀释好的酶标亲和素， 37°C 1 小时。每孔用 200 μL 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 μL 的显色液，室温静置 15-45min (在 $20-25^\circ\text{C}$ ，显色 25min 较合适)，注意避光。(在 37°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 Bioreader 4000PRO 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。

[0071] 结果显示第2组小鼠脾淋巴细胞在相应的HPV18L1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, 1×10^6 的脾淋巴细胞中的斑点数达到750(结果参见图3),表明重组rAAV2/1-HPV18L1疫苗能在BALB/C H-2K^d小鼠体内诱导较高的细胞免疫应答。

[0001]

SEQ ID NO:1

1 atggctctgt ggcggcccag cgacaacacc gtgtacctgc ctcccccaag cgtggcccgg
61 gtggtgaaca ccgacgacta cgtgaccggg accagcatct tetaccacgc tggcagcagc
121 agactgctga ccgtgggcaa cccctacttc cgggtgccag ccggcggagg caacaagcag
181 gacatcccca aggtgtccgc ctaccagtac cgggtgttcc ggggtcagct gcccgacccc
241 aacaagtfcg gctgcccga caacagcadc tacaaccccg agacacagcg gctggtgtgg
301 gcctgtgccg gcgtggaaat cggcagaggc cagcctctgg gcgtggcct gagcggccac
361 cctttctaca acaagctgga cgacaccgag agcagcccag ccgccaccag caactgtcc
421 gaggactgfc gggacaatgt gtccgtggac tacaagcaga cccagctgtg catcctgggc
481 tgcgccctg ccattggcga gactgggcc aagggcaccg cctgcaagag cagaccctg
541 agccagggcg actgcccccc actggaactg aagaacaccg tgctggaaga tggcgacatg
601 gtggacaccg gctacggcgc catggacttc agcacctgc aggacaccaa gtgcgagggt
661 cccctggaca tctgccagag catctgcaag taccocgaet acctgcagat gagecggcag
721 ccctacggcg acagcatgtt ctttgcctg cggagagagc agctgttcgc ccggcacttc
781 tggaaacagag ccggcaccat gggcgacacc gtgcccaga gcctgtacat caagggcaca
841 ggcatcgggg ccagccccgg cagctgtgtg tacagcccta gcccagcgg cagcatcgtg
901 accagcgaca gccagctgtt caacaagccc tactggctgc acaaggccca gggccacaac
961 aacggcatct gctggcaca ccagctgttc gtgaccgtgg tggataccac cagaagcacc
1021 aaactgacca tctgcgccag caccagagc cccgtgcctg gccagtacga cgccaccaag
1081 ttcaagcagt acagccggca cgtggaagag tacgacctgc agftcatctt ccagctgtgt
1141 accatcacc tgaccgcca cgtgatgagc tacatccaca geatgaacag cagcatcctg
1201 gaagattgga actfcggcgt gccccacc ccaccacca gcctggtgga tactacaga
1261 ttcgtgcaga gcgtggccat cactgtcag aaggatgccg cccctgcca gaacaaggac
1321 ccctacgaca agctgaagtt ctggaactg gacctgaaag agaagttcag cctggacctg
1381 gaccagtacc cctggggccg gaagttctg gtgcaggccg gactgeggcg gaagcccacc
1441 atcggccta gaaagagaag cccccagc gccaccacct ccagcaagcc tgccaagcgc
1501 gtgcgcgtga gagcccga gtga

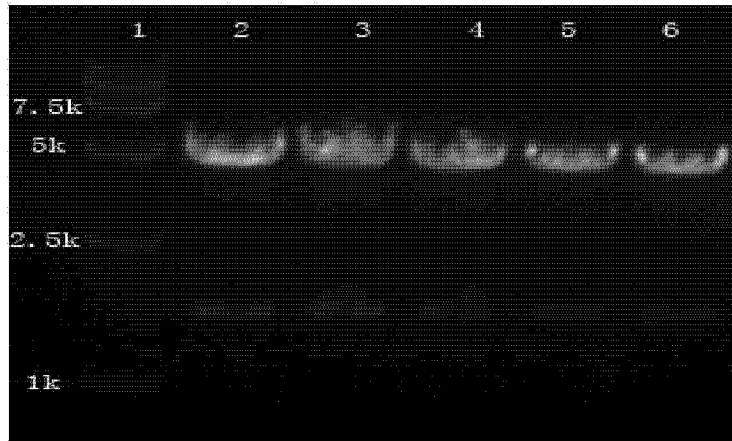


图 1

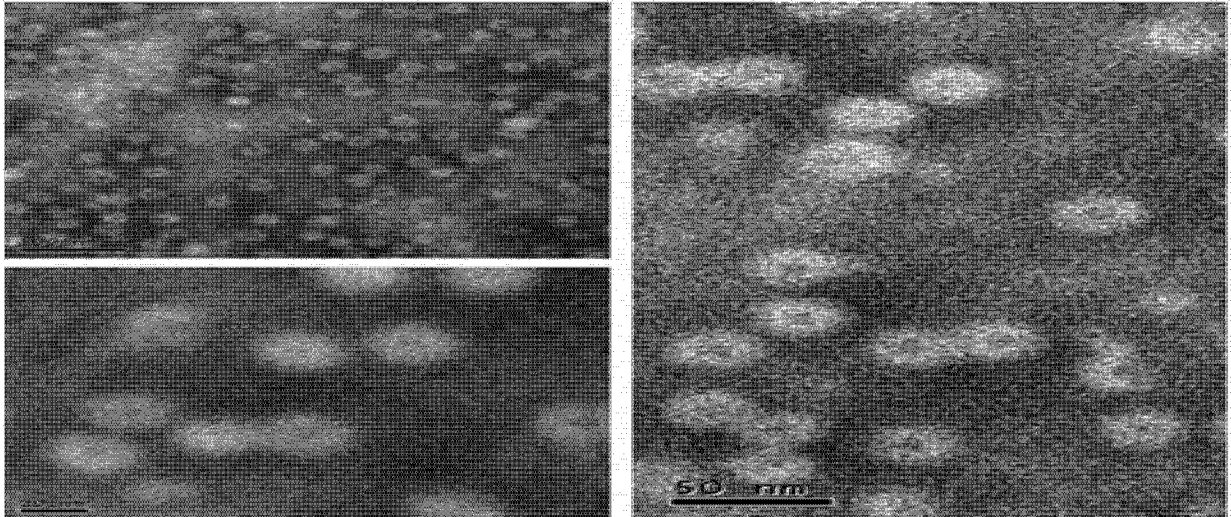


图 2

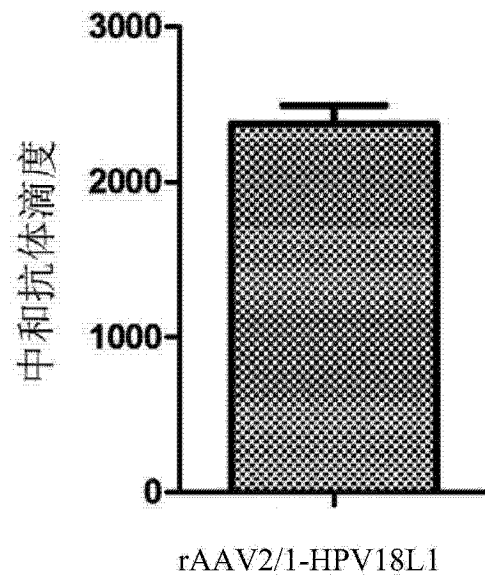


图 3

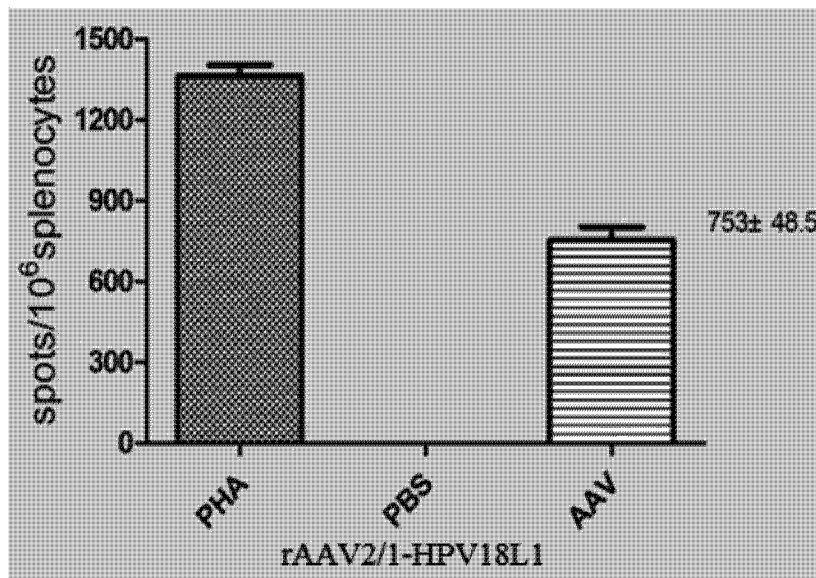


图 4