

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 1/14

A61K 38/16

A61P 35/00

[21] 申请号 200410000060. X

[43] 公开日 2005 年 7 月 20 日

[11] 公开号 CN 1640887A

[22] 申请日 2004. 1. 8

[21] 申请号 200410000060. X

[71] 申请人 北京中天康泰生物科技有限公司

地址 100029 北京市朝阳区惠新东街 8 号院 2
号楼 801 室

[72] 发明人 韩 苏 许佐良

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种用于生物治疗的“热休克蛋白
专用提取盒”

[57] 摘要

本发明涉及制备一种热休克蛋白专用提取盒。该提取盒可以是由热休克蛋白亲和树脂或亲和层析柱单独组成，或与实施亲和层析所需配制的各种母液等配套组成。其目的是为了更方便、快捷、高效、特异性地从组织或细胞中提取热休克蛋白(heat shock protein)及、或热休克蛋白-多肽复合体(heat shock protein complexes)。使用热休克蛋白专用提取盒分离纯化出来的热休克蛋白-多肽抗原复合体用于因自身细胞变异、因外源性病原体感染以及自身免疫等疾病的治疗和预防。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种热休克蛋白 (heat shock protein 简称 HSP) 及热休克蛋白-多肽复合体 (heat shock protein peptide complexes 简称 HSPPC) 专用提取盒。
2. 利用可识别热休克蛋白的抗体与固相树脂相偶联, 制备出热休克蛋白亲和树脂。
3. 利用可识别热休克蛋白的抗体与固相树脂相偶联, 制备出热休克蛋白亲和层析柱。
4. 与固相树脂偶联的热休克蛋白抗体包括可识别热休克蛋白家族中的任意成员, 如 HSP-60、HSP-70、HSP-90 和 HSP gp96 等。
5. 固相树脂可同时与任意一种或多种热休克蛋白抗体相偶联制备成亲和树脂或亲和层析柱。
6. 制备出的热休克蛋白亲和树脂或亲和层析柱可单独或与配制好的层析柱平衡液、洗脱液、透析液的母液, 或与已称量配制好的固体成分用于配置平衡液、洗脱液和透析液等, 将它们配套组成“热休克蛋白专用提取盒”。
7. 应用“热休克蛋白专用提取盒”方便、快捷、高效及特异性地从人或哺乳动物的病理组织、细胞或血液标本中提取出的热休克蛋白 (HSP) 及, 或热休克蛋白-多肽复合体 (HSPPC)。
8. 应用“热休克蛋白专用提取盒”方便、快捷、高效及特异性地从人或哺乳动物被外源性病原体包括细菌、衣原体、支原体、病毒等感染的体外培养的组织及细胞中提取出的热休克蛋白 (HSP) 及, 或热休克蛋白-多肽复合体 (HSPPC)。
9. “热休克蛋白专用提取盒”分离纯化出来的热休克蛋白-多肽复合体 (HSPPC) 作为免疫原用于对人或哺乳动物因外源性病原体 (包括细菌、支原体、衣原体和病毒等) 引起的感染性疾病的治疗和预防。
10. “热休克蛋白专用提取盒”分离纯化出来的热休克蛋白-多肽复合体 (HSPPC) 作为免疫原用于对人或哺乳动物因自身正常细胞变异 (如肿瘤等) 而引起的疾病的治疗和预防。
11. “热休克蛋白专用提取盒”分离纯化出来的热休克蛋白作为免疫原用于对

人或哺乳动物自身免疫疾病的治疗和预防。

12. “热休克蛋白专用提取盒”用于从肿瘤患者手术切除的实体瘤组织中分离纯化热休克蛋白-多肽复合体(HSPPC)用于该肿瘤患者的免疫个性化治疗和对患者直系亲属的预防性免疫。
13. “热休克蛋白专用提取盒”分离纯化出来的热休克蛋白-多肽复合体(HSPPC)作为免疫原的使用方式可为体内使用，如皮下注射、皮内注射、黏膜内注射等；及体外使用，如鼻腔喷雾，吸入性肺黏膜免疫、黏膜腔涂抹等，但不局限于此。

一种用于生物治疗的“热休克蛋白专用提取盒”

技术领域

本发明属于生物技术领域。

技术背景

高等生物体之所以能够在复杂的环境中生存是因为机体具有抵御外源入侵的病原体和消除内源变异细胞的能力。一旦这个能力减低或消退，机体就会生病或导致死亡。

高等生物体如哺乳动物和人的免疫系统具有体液免疫和细胞免疫的两套机制。一种是以 B 淋巴细胞为介导的体液免疫，B 淋巴细胞在脾脏和骨髓中发育成熟，B 淋巴细胞产生的抗体能特异性地识别和结合外源性生物大分子，阻断外源体对机体的侵害。抗原-抗体形成的复合物能够激发机体的补体反应和细胞反应，对携带该外源生物大分子的病原体产生吞噬和降解以排除入侵的病原体。

另一种是以在胸腺内发育成熟的 T 淋巴细胞为介导的细胞免疫。抗原递呈细胞将外源性病原体或内源性变异细胞所携带的异类分子经 MHC I 类和 MHC II 类途径将抗原信息递呈给 CD8 和 CD4 T 细胞，激发 T 细胞转变成细胞毒 T 细胞（CTLs）。经过 MHC 刺激转化而成的细胞毒杀伤细胞能够特异性地攻击和消除携带抗原的外源性细胞。T 淋巴细胞还能分泌产生多种细胞因子，刺激巨噬细胞非特异性地吞噬外源病原细胞。肿瘤细胞虽然能够刺激机体产生抗体反应但很难刺激 CTLs 激活启动细胞免疫，这是肿瘤细胞能够逃避机体免疫监视的原因之一。如果能够将体液免疫和细胞免疫同时调动起来就会极大地提高机体对消除外源性病原体

和自身变异细胞的能力，使机体能够战胜和排除外源病原体或自身变异细胞使疾病消除恢复健康。

随着现代生物技术的飞速发展，实验证明细胞内的热休克蛋白（HSP）具有识别和捕捉外源性生物大分子的能力。外源性生物大分子包括外来入侵的病原体，如细菌、支原体、衣原体、病毒所携带的生物大分子等，还包括体内由正常细胞发生突变（如肿瘤细胞等）而产生的变异细胞所携带的生物大分子。

热休克蛋白（HSP）是存在于细胞浆内及内质网中的一类家族性看家蛋白，根据 HSP 的分子大小和结构特性可分为多个家族成员，如 HSP-27、HSP-40、HSP-60、HSP-70、HSP-90、HSP-gp96、HSP-110 等。它们平时处于低水平的表达。当细胞出现生理性、病理性或环境的突发性变化时，HSP 的表达会急剧提高，因此热休克蛋白又被称为“应激蛋白”。HSP 通过参与蛋白质的结合、折叠、亚单位的装配、跨膜转运及抗原递呈对细胞的生长、分化、基因转录和自我保护发挥重要作用。

HSP 目前被应用在预防和治疗传染性疾病和肿瘤治疗就是利用其具有结合外源或自身变异细胞所携带的变异蛋白质或多肽分子群的特性。HSP 结合外源病原体或自身细胞变异产生的肿瘤特异蛋白、多肽分子群，参与抗原递呈而其 HSP 本身并不产生抗原性。T 淋巴细胞最终根据 HSP 递呈的外源分子、多肽来激发机体的免疫系统来攻击和消除携带递呈抗原的外源入侵病原体。因此 HSP 又被称为“分子伴侣”。研究发现 HSP-70、HSP-90、HSP gp96 等不仅参与抗原的加工递呈，而且还可作为抗原递呈分子直接将抗原递呈给 T 细胞，激发 T 细胞介导的特异性细胞免疫。因此“HSP-多肽抗原复合体”不仅能激发机体对外源病原体产生体液免疫，同时还能产生细胞免疫反应，恢复和提高了机体的免疫监视功能。HSP 的这一重要特性奠定了对传染性疾病及肿瘤免疫的个性化治疗和预防的理论和应用的基础。

本发明是为了方便实验室和医院从人或哺乳动物组织或细胞中提取热休克蛋白及，或热休克蛋白-多肽复合体而设计的一种“热休克蛋白专用提取盒”。

发明内容

通过运用生物化学的方法，如亲和层析的方法或 ADP-agarose 柱层析的方法（参考 Peng et al., *Journal of Immunological Methods*, 204 (1997) 13-21）可非常简便地、特异性地将 HSP 蛋白及 HSPPC 从病理组织、细胞中、从体外被病原体感染的组织及细胞中分离纯化出来。利用可识别人或哺乳动物热休克蛋白的抗体，如 HSP-70、HSP-90 或 HSP gp96 抗体制成亲和层析柱，将手术取出的肿瘤组织经切碎、均浆后的细胞裂解液过亲和层析柱，收集洗脱下的专一性吸附的 HSP 及 HSPPC 蛋白，经过高效液相色谱（HPLC）的进一步纯化后的 HSPPC 可注射回该肿瘤病人的体内。以这种方式分离纯化出来的热休克蛋白结合有肿瘤细胞中变异了的蛋白和多肽分子群，将这种取之于肿瘤病人的 HSP-肿瘤抗原多肽复合体注射回病人激发肿瘤病人对自身肿瘤的体液免疫和细胞免疫的双重识别和攻击，这种治疗方式开辟了肿瘤个性化免疫治疗的新形式。

“热休克蛋白专用提取盒”就是为了满足为肿瘤病人提取自身变异组织内的变异蛋白和多肽激发病人对自身肿瘤的识别和攻击，防止病毒携带者可能引起的交叉感染而提供给肿瘤病人专人专用实现肿瘤个性化治疗的便利工具。

将病毒感染的细胞在体外大量培养，将被病毒感染的细胞收集并裂解。细胞裂解液通过使用“热休克蛋白专用提取盒”中提供的 HSP 亲和层析柱，收集洗脱下的特异性结合病毒多肽分子群的 HSPPC。以这种方式分离纯化出来的 HSPPC 结合有病毒抗原多肽分子群，即为 HSP-病毒抗原多肽复合体(HSPPC)。将同源细胞内提取出来的 HSPPC 给已经感染了该病毒的同类动物注射能激发其机体抵抗病毒的能力，起到治疗的作用。为尚未感染的同类动物注射起到被动免疫预防被感染的作用。

利用“热休克蛋白专用提取盒”提取 HSPPC 的作用是激发机体对热休克蛋白结合的抗原多肽的免疫识别和攻击，HSPPC 作为抗原的优点是：

1. HSP 本身并不参与免疫反应，只有它结合的外源抗原分子才会引起免疫反应，因此不会造成自身免疫，安全性好。
2. HSP 所结合的是外源目标病原体分子群，它们激发出的抗体是针对由外到内的整个目标病原体，对病原体所携带的抗原包括面广。
3. 使用 HSPPC 免疫不用搭配使用佐剂，简便易行。

4. HSPPC 可以引起机体产生体液免疫和细胞免疫，生物有效性高。
5. 从取出的病理标本中提取 HSPPC 再注射回该个体内，实现和达到了有针对性地个性化治疗的目的，专一性好。
6. 在畜牧业防病治病中，通过体外大量培养目标病原体感染的组织或细胞，从中提取 HSPPC 用于对目标病原体引起的疾病的治疗和预防，该方法可广泛应用于因各种病原体引起的传染性疾病的的治疗和预防，普遍性好。
7. HSPPC 分子群对机体无毒副作用，应用性强。
8. 应用“热休克蛋白专用提取盒”使得整个提取过程和操作变得简单、快捷、高效、特异性强。

制备的免疫制剂可以从经过偶联了 HSP-60 抗体、或偶联了 HSP-70 抗体、或偶联了 HSP-90 抗体、或偶联了 HSP-gp96 抗体的亲和层析柱上洗脱下来的 HSPPC，使用它们的洗脱产物，如 HSP70-抗原复合体、或 HSP90-抗原复合体、或 HSP gp96-抗原复合体作为免疫制剂的成分。

“热休克蛋白专用提取盒”中提供的 HSP 亲和层析柱可以使用一种或一种以上的 HSP 抗体以不同组合及，或不同比例偶联在树脂上，如将 HSP-70 抗体、HSP-90 抗体和 HSP gp96 抗体三种抗体以相同的比例偶联在树脂上一同装在一个亲和层析柱内。从该亲和层析柱上洗脱下来的产物含有 HSP70-抗原复合体、HSP90-抗原复合体和 HSP gp96-抗原复合体，经过透析除去多余的盐分并测蛋白浓度。将含有这三种 HSPPC 并存的洗脱产物可直接成为免疫制剂中的成分，将它们直接或经过 HPLC 进一步纯化后可作为免疫制剂成分。

具体实施方式

“热休克蛋白专用提取盒”的组成：

制备完成的 HSP 亲和树脂以每 10 ml/袋或 20ml/袋或以 10ml/根、20ml/根亲和层析柱为一个包装盒。为满足不同的提取量需求还可制成和提供不同的包装规格放置在 4℃冷库中保存。

A. 与热休克抗体偶联的树脂可采用 CNBr-Sepharose 4B，与其偶联的抗体可以是 HSP-60，或 HSP-70，或 HSP-90，或 HSP gp96 抗体等可识别热休克蛋白家族的

任意一种单一抗体制成亲和树脂及亲和层析柱。

B.与 CNBr-Sepharose 4B 树脂偶联的抗体可以是 HSP-60, 或 HSP-70, 或 HSP-90, 或 HSP gp96 抗体等可识别热休克蛋白家族的任意一种以上的抗体相互组合与树脂偶联制成的亲和树脂及亲和层析柱。

* 可配制 1000 ml 平衡液的固体包装 5 袋 (每袋使用时只需加入 1000ml 蒸馏水并按照说明调节 PH)

* 10X 洗脱液 500ml/瓶

* 10X 透析液 500ml/瓶。

* “热休克蛋白专用提取盒”可包括或不包括。

防腐保存:

制备好的亲和层析柱如需放置一段时间, 应使用防腐液 (含有 1/10000 迭氮钠的 PBS) 冲洗, 使用防腐液浸泡的层析柱切勿冷冻, 放置在 4°C 中保存以免干燥, 1 年之内性能稳定。

材料来源:

使用“热休克蛋白专用提取盒”提取的 HSP 及、或 HSPPC 可以从人或哺乳动物的如下来源提取:

1. 手术切下的肿瘤组织。
2. 体内其它病理组织。
3. 血液标本中获得的细胞
4. 在体外培养的被病原体感染的哺乳动物或人细胞株。
5. 可能的其它来源。

分离纯化操作过程:

将“热休克蛋白专用提取盒”的包装打开, 取出 10ml HSP 亲和层析柱安装在冷室中或放置在 4°C 冰柜中的架子上固定好。层析柱的下端用管子连接紫外监测器然后进入收集瓶。将预冷的平衡液加到层析柱的顶端, 保持柱下端的流速约为 3ml/min, 冲洗 10 分钟后可用夹子下端管子等待上样。

样品的制备:

将组织块剪成小碎块，放到匀浆器中在冰浴中匀浆，用预冷的平衡液冲洗匀浆器并收集匀浆器内的浆液。离心将浆液中的大块组织及细胞碎片除去，取上清液加到亲和层析柱上。保持柱下端的流速小于 0.5ml/min，在此期间还可采取几次分别中断流出 5 分钟的措施保障上清液中的 HSP 与树脂偶联的抗体充分地起反应。当上的组织细胞浆液全部流进树脂后再用平衡液冲洗亲和柱，直至非特异性的蛋白从柱中全部被冲洗干净为止，紫外吸收值 $OD_{280} < 0.02$ 。

洗脱液能将与亲和柱中树脂偶联的 HSP 抗体反应的 HSP 蛋白从柱上的抗体上解离下来。使用洗脱液将特异性被亲和柱吸附的 HSP 蛋白洗脱并收集。经过亲和层析柱的一步法纯化后，存在于组织或细胞裂解液中的 HSP 最大可达到 1 万倍的富集浓缩。

亲和层析是生物化学领域中一种非常成熟的常规技术，洗脱液的配制可根据不同的亲和层析柱的具体情况按照由实验室摸索出来的最佳洗脱条件来制定，如洗脱液的 PH 呈较强的酸性，收集到的洗脱液应该立刻用呈碱性的缓冲液予以中和，防止洗脱得到的蛋白变性。

由于经过洗脱并中和后的收集物中含有高浓度盐份，因此对洗脱收集组分要进行透析除盐。将收集组分装入分子量透过值低于所收集蛋白的透析袋中对预冷的生理盐水透析 3 次，每次 2 小时以上。

纯化出的蛋白可直接用做免疫原或采用 HPLC 做更进一步的纯化。取样做蛋白分析和浓度鉴定之后按照需求分装，然后冷冻干燥保存在 4℃。

操作流程:

为能够简明扼要地说明 HSPPC 的提取过程，将提取 HSPPC 的工艺流程以图形的方式表示出来，附图是“提取 HSPPC 的工艺流程”图。

经过分离纯化处理后的 HSPPC 可分装在瓶中经冷冻干燥后内容物呈絮状或粉末状。瓶中的 HSPPC 保存在 4℃ 冰箱中 1 年之内效果不变。

使用时用注射用生理盐水将瓶中的内容物 HSPPC 溶解，做多点皮下、皮内注射或黏膜内注射。成人治疗注射剂量范围在 5ug-1mg/次之间，免疫间隔 2-8 个星期。治疗同时可搭配使用细胞因子、胸腺肽 $\alpha 1$ 等免疫增强剂。注射四次为一个治疗疗程。预防保护性可为注射一次或多次，剂量范围在 1ug-1mg/次之间。注射间隔为 1 个星期至 4 个月之间。

家畜使用时使用注射用生理盐水溶解瓶中的内容物 HSPPC，在动物的四肢、背部、颈部等不同部位进行多点皮下、皮内注射或黏膜注射。根据动物的体重差异，注射剂量在 1ug-1mg/次范围之内。每次免疫间隔 1-10 个星期之间。作为预防和治疗用可注射一次或多次。

实施例 1:

目的:

使用“热休克蛋白专用提取盒”快速、高效、特异性地从乳腺癌患者手术切除的肿瘤组织中提取 HSPPC。从乳腺癌患者肿瘤组织中提取的热休克蛋白结合有肿瘤细胞变异后产生的肿瘤特异性抗原，经过提纯后将病人的肿瘤抗原再回注到该病人体内，用于调动该病人的免疫系统对自身所患肿瘤的免疫监控，激发该病人自身的体液免疫和细胞免疫对自身所患的肿瘤细胞做特异性的识别和攻击，清除扩散和弥散在全身各个部位的肿瘤细胞，达到对肿瘤生物治疗的目的。

利用“热休克蛋白专用提取盒”可方便医院生物治疗部门提取 HSPPC 为患有实体瘤的肿瘤患者提供个性化免疫治疗的服务。提取出的乳腺癌 HSPPC 还可为该患者的直系女性亲属提供预防性免疫保护，使她们防患于未然。

取材和保存:

将手术切除的人乳腺癌肿瘤组织立即放置在 4℃ 冰壶中带到实验室进行 HSPPC 的提取。如不能马上开展提取或还有多余的组织需要保存，将肿瘤组织置于密闭的容器中放置到 -80℃ 的冰箱中或液氮中保存。

制备“热休克蛋白专用提取盒”中的亲和层析柱:

购买已活化的琼脂糖凝胶树脂 CNBr-Sepharose 4B。

偶联前处理：

称取 100g CNBr-Sepharose 4B 用 1mM/L 盐酸充分浸洗膨胀凝胶树脂再用偶联缓冲液 (0.1 Mol/L NaHCO₃, 0.1 Mol/L Na₂CO₃ 和 0.5 Mol/L NaCl, pH 8.5) 洗 2 次。

偶联抗体到树脂上：

处理完毕的凝胶树脂与等体积含有 10 μMol/L HSP-70 抗体的偶联缓冲液混合装在瓶中，旋紧瓶盖以防溶液泄露，在 4℃ 冷室中固定在摇床上温和摇动混合过夜。次日弃去溶液保留凝胶树脂。

封闭树脂上多余的结合位点：

向凝胶树脂中加入封闭溶液 (0.2 Mol/L 甘氨酸) 直至浸没瓶中树脂，4℃ 下旋转混合 1 小时，弃去溶液再以同样方式做封闭反应一次以彻底封闭 Sepharose 4B 上未与抗体结合的位点。用偶联缓冲液和醋酸盐缓冲液 (0.1 Mol/L NaCH₂COOH 和 0.5 Mol/L NaCl, pH4.0) 交替清洗树脂 2 次，再用 0.15 Mol/L PBS 缓冲液 (pH7.2) 清洗凝胶树脂 2 次。将偶联好 HSP-70 抗体的琼脂糖凝胶树脂以每 10ml 的量分装到层析柱中。避免装柱时在树脂床体中留有气泡。制备完成的 HSP-70 亲和层析柱使用封口膜将层析柱的上下两端封闭以保持树脂浸没在 PBS 缓冲液中防止干燥。使用铝塑薄膜将亲和层析柱整个包装起来防止污染。

制备“HSP-70 蛋白专用提取盒”：

将每支包装好的 HSP-70 亲和层析柱放置到塑料盒中 4℃ 冷库或冰箱中保存，有效期 1 年。制备完成的亲和层析柱不得冷冻，也不能放置在室温下保存。制备完成的 HSP-70 亲和层析柱随时可供上样做亲和层析用。“HSP-70 蛋白专用提取盒”在运输的过程中需放置在冰盒中。

组织液的制备：

将手术取得的乳腺癌组织剔去正常组织后切割成小碎块放入 -20℃ 冰箱中冷冻 1 小时，然后再将其置入匀浆器中在冰浴中研磨。向研磨器中逐渐加入 20ml 预冷的 PBS 缓冲液并继续研磨。研磨液经冷冻离心机 8000 rpm 10 分钟离心取上清液。离心下来的沉淀再用 20ml 预冷的 PBS 缓冲液分散并继续研磨，研磨液离心收集上清液。合并两次离心的上清液过亲和层析柱。

上亲和层析柱：

将离心后的研磨上清液加到亲和层析柱上，保持流速不超过 0.5ml/min 以保障上清液中的 HSP-70 蛋白与亲和柱上偶联的 HSP-70 抗体得到充分反应。待样品流完后用大量的 PBS 流洗亲和柱，其目的在于将杂蛋白洗脱干净直至流出液的紫外吸收值 $OD_{280} < 0.02$ 。

洗脱亲和物：

用 0.1 Mol/L 的甘氨酸-盐酸溶液 (pH2.4) 洗脱亲和层析柱中与 HSP-70 抗体结合的蛋白。收集的洗脱组分迅速用 0.1 Mol/L Tris-Cl 缓冲液 (pH8.0) 中和以免蛋白变性。

洗脱后的处理：

将收集的洗脱组分对预冷的生理盐水透析 3 次，每次 2 小时以上。纯化产物可取出小部分做分离纯化和蛋白含量的鉴定。其余的可进行分装然后冷冻干燥保存。

分离物的鉴定：

利用亲和层析的方法纯化出的 HSP70-乳腺癌抗原复合体可用高效液相色谱 (HPLC) 或聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析洗脱产物的纯度，并用紫外分光光度法做蛋白含量的测定。

制备免疫制剂的分装和保存：

从乳腺癌组织中分离纯化出的 HSP 是一类结合有乳腺癌特异抗原多肽的 HSP，即 HSP-乳腺癌多肽抗原复合体。将它们以每 5ug/安瓿分装再冷冻干燥。

使用指导：

提纯的 HSP-乳腺癌多肽抗原复合体再注射回手术患者的体内，HSPPC 将特异性地激发该肿瘤病人对自身所患的乳腺癌细胞所携带的特异性抗原而产生细胞免疫和体液免疫的双重功效。另外，大量的研究和观察发现乳腺癌具有明显的家族倾向性。利用分离纯化的 HSP-乳腺肿瘤多肽抗原复合体给该乳腺癌患者的直系女性亲属进行预防性免疫，降低直系亲属中乳腺癌的发病率。

用注射用生理盐水溶解安瓿中冷冻干燥的 HSP70-乳腺癌多肽抗原复合体。每次在皮下或皮内多点注射，每次共注射 5ug 或 5ug 以上。相隔 3 星期后再进行第

二次注射，第三次和第四次免疫治疗与前次免疫相隔 4 个星期，注射剂量和方式与第一次相同。治疗方式为四次免疫为一个疗程。

预防性注射为一次性免疫，每个直系女性亲属采取在皮下或皮内进行多点注射，一次共注射 5ug HSPPC。

实施例 2:

目的:

使用“热休克蛋白专用提取盒”快速、高效、特异性地从因感染猪地方性流行性肺炎而死亡的病理脏器组织中提取 HSPPC 用于预防其它猪感染地方性流行性肺炎和对已感染的猪进行治疗。

猪地方性流行性肺炎是一种由支原体引起的流行性疾病，猪被传染后死亡率很高。该病是集约化养殖场内的常见疫病，每次发生会给养殖场带来重大的经济损失。

制备“热休克蛋白专用提取盒”中的亲和树脂:

购买已活化的琼脂糖凝胶树脂 CNBr-Sepharose 4B。

偶联前处理:

称取 100g CNBr-Sepharose 4B 用 1mM/L 盐酸充分浸洗膨胀凝胶树脂再用偶联缓冲液 (0.1 Mol/L NaHCO₃, 0.1 Mol/L Na₂CO₃ 和 0.5 Mol/L NaCl, pH 8.5) 洗 2 次。

偶联 HSP 抗体到树脂上:

处理完毕的凝胶树脂分别加入等体积的含有 10 μMol/L 猪 HSP-70 抗体的偶联缓冲液和等体积含有 10 μMol/L 含有猪 HSP gp96 抗体的偶联缓冲液在瓶中混合，旋紧瓶盖以防溶液泄露。将混合了树脂和抗体的瓶固定在摇床上在 4℃ 的环境中温和摇动过夜。次日弃去溶液保留凝胶树脂。

封闭树脂上多余的结合位点:

向瓶中凝胶树脂加入封闭溶液 (0.2 Mol/L 甘氨酸) 直至浸没树脂，在 4℃ 下旋转混合 30 分钟。弃去溶液，再向瓶中树脂加入封闭溶液混合 30 分钟后弃去溶液保留树脂，经此处理充分封闭 Sepharose 4B 上未与抗体结合的位点。用偶联缓冲液和醋酸盐缓冲液 (0.1 Mol/L NaCH₂COOH 和 0.5 Mol/L NaCl, pH4.0)

交替冲洗树脂 2 次，再用大量 0.15 Mol/L PBS 缓冲液 (pH7.2) 清洗凝胶树脂 2 次。

HSP-70 和 HSP gp96 亲和树脂制备完成后分装在铝塑薄膜袋中或塑料瓶中以防防止污染和干燥。

制备“HSP-70 和 HSP gp96 蛋白专用提取盒”

将亲和树脂以 10ml、20ml、50ml 等不同量分装到塑料瓶中装入到盒中。包装好的“HSP-70 和 HSP gp96 蛋白专用提取盒”随时可供使用。“HSP-70 和 HSP gp96 蛋白专用提取盒”不得冷冻并保存在 4℃环境中有效期为 1 年。

取材和保存:

将患有严重流行性肺炎的猪的病理性肺脏取出，用水清洗干净后用绞肉机绞碎。绞碎的组织放置在-20℃冰箱中冷冻 1 小时，然后再按照每 500 克组织加入 500 毫升预冷的蒸馏水用超声破碎细胞，目的是要使细胞裂解释放出胞内溶液。将超声后的组织细胞浆液以 3000rpm/min 离心 15 分钟，收集上清液。离心后的沉淀再用预冷的 300ml 蒸馏水分散，经过再次超声及离心，收集上清液。将两次离心的上清液合并用于与 HSP-70 和 HSP gp96 亲和树脂做亲和反应。

亲和反应:

“热休克蛋白专用提取盒”中已偶联好 HSP-70 和 HSP gp96 抗体的琼脂糖凝胶树脂 50ml 装到瓶中，再加入肺组织裂解离心上清液，旋紧瓶盖防止溶液泄露。将混和有抗体的树脂和组织细胞裂解上清液的瓶固定在摇床上在 4℃下温和摇动过夜。

装柱及清洗:

次日将经过一夜充分混合反应好的树脂装到层析柱中，让瓶中的反应液从柱的下端出口缓缓流出，使树脂沉积到柱中。避免柱中树脂床内留有气泡。待最后余留的溶液进入树脂界面后，开始用大量的 PBS 流洗亲和柱直至流出液的紫外吸收值 $OD_{280} < 0.02$ ，其目的在于将柱内树脂床中的杂蛋白清洗干净。

洗脱亲和物:

用 0.1 Mol/L 的甘氨酸-盐酸溶液 (pH2.4) 洗脱亲和层析柱中与 HSP-70 抗体、HSP gp96 抗体结合的蛋白，即 HSP-70 和 HSP gp96 结合的猪肺炎多肽抗

原复合体。收集的洗脱组分迅速用 0.1 Mol/L Tris-Cl 缓冲液 (pH8.0) 中和以免蛋白变性。

洗脱后的处理:

将收集的洗脱组分对预冷的生理盐水透析 3 次, 每次 2 小时以上。纯化产物可取出小部分做分离纯化和蛋白含量的鉴定。其余的可进行分装再冷冻干燥后保存。

分离物的鉴定:

利用亲和层析的方法纯化出的 HSp70 和 gp96—抗原复合体可用高效液相色谱 (HPLC) 或聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析洗脱产物的纯度, 并用紫外分光光度法做蛋白含量的测定。

分离纯化产物的分装和保存:

将分离纯化的 HSP-70、gp96—猪肺炎多肽抗原复合体以 1mg/安瓿分装再进行冷冻干燥。冻干后的纯化产物呈现絮状或粉末状。保存在 4℃ 中一年内有效。

使用指导:

从病猪的肺组织中提取出来的热休克蛋白 HSP-70 和 HSP gp96 结合了外来入侵的致病支原体的多肽抗原分子群。将它们提取出来用于对尚未感染的猪做预防性免疫注射, 使猪被动接种含有地方性流行性肺炎的抗原分子群。经过免疫的猪当遇到肺炎病原体时, 体内的淋巴细胞会对病原体所携带的抗原有所识别并激发剧烈的体液免疫和细胞免疫来杀灭和清除病原体, 对流行性肺炎袭来时有抗病能力。

对没有感染猪地方流行性肺炎的猪采取被动免疫, 每只猪在皮下或皮内给予多点注射, 共注射 50ug/只/次。

结论:

热休克蛋白中的 HSP-70、HSP-90 和 HSP gp96 具有结合外来异物分子的能力。它们将外来入侵的病原体外表面和内部的异源分子群、机体自身变异的细胞外表面和内部的变异分子群作为抗原递呈给淋巴细胞, 激发机体对外源致病体或自身变异细胞的排斥和攻击, 最后达到清除外源异物的目的。

由于热休克蛋白结合的是外源性抗原分子群形成 HSPPC, 把它们作为目标抗

原免疫可以调动被免疫者全身的抗体免疫和细胞免疫两大系统对携带有目标抗原的病原体或机体内部变异了的细胞所携带的异类蛋白多肽进行整体性地全方位地识别、攻击和清除。调动机体自身的免疫系统进行有针对性地排除目标病原体的效率高、安全性好。

目前在牲畜中多数致病体引发的流行性传染病还没有制备出高效疫苗。致病体，如流感病毒等在环境因素的影响下还保持着高频率的突变，花费大量经费研制出的疫苗依然难以追赶病原体的高频突变速率。导致养殖户和饲养场在日常饲料中添加大量的抗生素以期望达到抗病的目的。由此引发的恶果是抗生素泛滥对食用肉和乳制品造成的污染。

利用“热休克蛋白专用提取盒”从牲畜流行病造成的病理脏器中直接提取结合了致病体多肽抗原分子群的热休克蛋白，在新疫情爆发时，建立快速对应机制，无须对病原体进行详细分类鉴定就可以直接快速制备抗流行病的免疫疫苗，迅速遏止流行性疾病的快速蔓延。应用“热休克蛋白专用提取盒”建立对流行病的快速，有针对性的反应还避免了使用大剂量的抗生素，降低化学药物在体内的残留量，提高食用肉制品和奶制品的安全性。

提取 HSPPC 的工艺流程：

