

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 2 月 25 日 (25.02.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/031270 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 39/095 (2006.01) *A61K 39/112* (2006.01)
A61K 39/104 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/106654

(22) 国际申请日: 2019 年 9 月 19 日 (19.09.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910777479.2	2019年8月22日 (22.08.2019)	CN
201910777473.5	2019年8月22日 (22.08.2019)	CN
201910777606.9	2019年8月22日 (22.08.2019)	CN
201921369450.2	2019年8月22日 (22.08.2019)	CN
201910777595.4	2019年8月22日 (22.08.2019)	CN

(71) 申请人: 四川大学 (SICHUAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国四川省成都市一环路南一段
24号, Sichuan 610065 (CN)。

(72) 发明人: 王震玲 (WANG, Zhenling); 中国四川省
成都市成都天府国际生物城 (双流区生物

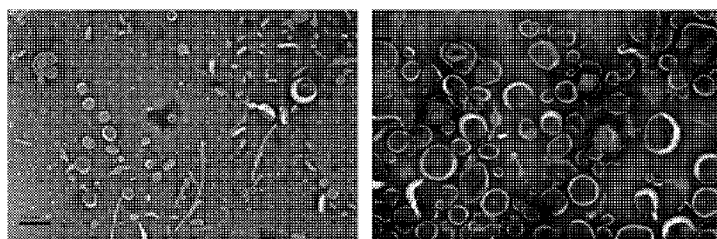
城中路二段18号), Sichuan 610200 (CN)。魏
于全 (WEI, Yuquan); 中国四川省成都市成都
天府国际生物城 (双流区生物城中路二
段18号), Sichuan 610200 (CN)。

(74) 代理人: 重庆恩洲知识产权代理
事务所 (CHONGQING ENZHOU INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY (SPECIAL GENERAL PART-
NERSHIP)); 中国重庆市渝中区五一路99号平安
国际金融中心33-7#, Chongqing 400010 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: BACTERIAL MEMBRANE VESICLES, AND SEPARATION AND PREPARATION SYSTEM AND METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 细菌膜囊泡及其分离制备系统和方法



A

B

图 1

(57) Abstract: The present invention belongs to the field of microbiology, and specifically relates to membrane vesicles (MVs) isolated from bacteria, a separation and preparation system and method for the membrane vesicles, and use of the membrane vesicles. The bacteria include Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria. The bacteria are irradiated with ionizing rays, then separating and purifying membrane vesicles produced therefrom. The membrane vesicles produced can be used as vaccines, adjuvants of vaccine, and/or drug carriers. Further provided is a biological composition comprising the membrane vesicles and inactivated bacteria. Further provided are a preparation, separation and purification system for the bacterial membrane vesicles and a corresponding method. The membrane vesicles prepared by using said system and method have a large yield and high purity, and is easy to be produced industrially.

(57) 摘要: 属于微生物学领域, 具体涉及一种从细菌中分离的膜囊泡(MVs)以及所述膜囊泡的分离和制备系统和方法, 以及所述膜囊泡的应用。所述的细菌包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。采用电离射线辐照细菌, 分离并纯化其产生的膜囊泡, 制得的膜囊泡可作为疫苗、疫苗佐剂、和/或药物载体。还提供一种生物组合物, 包括所述膜囊泡和灭活细菌。还提供一种细菌膜囊泡的制备及分离纯化系统以及相应的方法, 利用该系统及方法制得的膜囊泡产量大、纯度高、易于工业化生产。

WO 2021/031270 A1

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区
保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

细菌膜囊泡及其分离制备系统和方法

[1]. 本申请要求 2019 年 8 月 22 日提交的中国发明专利 1) 201910777479.2“细菌膜囊泡及其制备方法与应用”；2) 201910777473.5“金黄色葡萄球菌膜囊泡及其制备方法与应用”；3) 201910777606.9“铜绿假单胞菌膜囊泡及其制备方法与应用”；4) 201921369450.2“一种细菌膜囊泡的生产系统和分离纯化系统”；5) 201910777595.4“一种细菌膜囊泡的生产系统和分离纯化系统及方法”的优先权，这五件优先权专利申请以引用方式全文并入。

技术领域

[2]. 本发明属于微生物学领域，具体涉及一种细菌膜囊泡以及这种膜囊泡的分离和制备系统及方法，以及这种膜囊泡的应用。

背景技术

[3]. 膜囊泡(MVs, membrane vesicles)是细菌细胞（包括革兰氏阳性菌和阴性菌）外膜产生的囊泡状结构产物。多数为球形，直径大约 20 - 250 nm (Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles (革兰氏阴性菌细胞壁结构及其产生的膜囊泡), Beveridge T, Journal of Bacteriology, 1999 vol: 181(16) pp: 4725-33)。细菌膜囊泡含有多种生物活性大分子如核酸、脂多糖、外膜蛋白等成分，以及金属离子、酶、信号分子等 (Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles (经分泌产生的细菌外膜囊泡的生物功能与起源), Kulp A, Kuehn M, Annual Review of Microbiology, 2010 vol: 64(1) pp: 163-184)。它在细菌的多种生命活动中扮演着重要角色，如产生毒力因子、压力应激反应、营养摄取，及作为细菌间、细菌与宿主细胞间进行信息交流的载体等。

[4]. 膜囊泡的产生发生在细菌的任何生长阶段，不同于细胞裂解及凋亡，研究发现在压力刺激、缺氧、抗生素压迫等情况能够促进细菌产生膜囊泡。然而，自然生成的细菌膜囊泡产量低，往往需要培养大量的菌体才能收获一定量的膜囊泡，并且后续还需要额外的纯化工艺才能得到一定质量的膜囊泡。

[5]. 现代工艺技术在生产制备及纯化细菌膜囊泡时存在以下问题：1) 利用抗生素、去污剂、氧化剂等手段虽然能促进膜囊泡产生，但也伴随着有毒残留问题，给其应用带来了不确定性。2) 上述干预因

素刺激细菌产生膜囊泡的效率也相对较低,且该制备工艺不能实现标准化生产。3) 上述方法会使菌体本身的外膜抗原性、构象等可能发生变化,进而影响囊泡,限制其后续应用。

发明内容

[6]. 针对以上技术问题,本发明提供一种细菌膜囊泡以及分离生产这种细菌膜囊泡的系统和方法,包含五个子发明(即 A 发明、B 发明、C 发明、D 发明和 E 发明)以及基于这五个子发明的各自拓展。

[7]. 本发明首先公开了一种从灭活细菌中分离的膜囊泡。所述灭活细菌包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,以及基因工程菌。本发明还提供了这种膜囊泡的分离和制备方法,以及作为疫苗的应用。本发明首次采用电离射线 X 射线辐照细菌,分离并纯化其产生的 MVs,制得的 MVs 可作为疫苗、疫苗佐剂、和/或药物载体。

[8]. 在另一方面,本发明还公开了一种本发明提供了一种从灭活铜绿假单胞菌中分离的膜囊泡。本发明还提供了这种膜囊泡的分离和制备方法,以及作为疫苗的应用。以及该细菌疫苗的应用。本发明首次采用电离射线 X 射线辐照铜绿假单胞菌,分离并纯化其产生的 MVs,制得的 MVs 可作为疫苗、疫苗佐剂、和/或药物载体。

[9]. 在另一方面,本发明还公开了一种从灭活金黄色葡萄球菌中分离的膜囊泡。本发明还提供了这种膜囊泡的分离和制备方法,以及作为疫苗的应用。以及该细菌疫苗的应用。本发明首次采用电离射线 X 射线辐照金黄色葡萄球菌,分离并纯化其产生的 MVs,制得的 MVs 可作为疫苗、疫苗佐剂、和/或药物载体。

[10]. 在另一方面,本发明还公开了一种用于细菌膜囊泡的生产系统,其依次设有发酵罐、紫外分光光度设备和辐照设备,细菌通过在发酵罐中发酵增殖,然后通过紫外分光光度设备控制菌液中的含菌量在一定限度内,再采用辐照设备对菌液进行射线辐照,促进细菌大量产生膜囊泡。相应地,本发明还提供了一种细菌膜囊泡的纯化系统和一种细菌膜囊泡的分离系统,利用该系统制得的膜囊泡产量大、纯度高、易于工业化生产。

[11]. 在另一方面,本发明还公开了一种细菌膜囊泡的生产系统及方法,该生产系统依次设有发酵罐、紫外分光光度设备和辐照设备,细菌通过在发酵罐中发酵增殖,然后通过紫外分光光度设备控制菌液中的含菌量在一定限度内,再采用辐照设备对菌液进行射线辐照,促进细菌大量产生膜囊泡,从而提高膜囊泡的含量。相应地,本发明还提供了一种细菌膜囊泡的分离纯化系统及纯化方法,利用该方法制得的膜囊泡产量大、纯度高、易于工业化生产。

本发明有益效果

[12]. 本发明首次采用电离射线 X 射线辐照细菌分离并纯化其产生的 MVs。不添加抗生素及其他化学刺激物质，因此避免了刺激物残留及刺激物本身对膜囊泡导致的不良作用。同时工艺流程简单、适合工业放大化、标准化生产；囊泡产量高，高效、放大效果及纯化效果好，可以用于囊泡的大量制备。制备的囊泡与正常囊泡相比，产量提高数十倍具有较好的免疫原性。优化生产后得到的细菌膜囊泡后续进一步的开发应用前景广阔。此外，本发明制备的细菌膜囊泡可直接作为疫苗使用。

[13]. 本发明提供的细菌膜囊泡的生产系统能促进细菌大量产生的膜囊泡，适用于工业化生产；本发明提供的细菌膜囊泡的纯化及分离系统能除去发酵废液、细菌鞭毛、细菌分泌物等，得到的膜囊泡纯度高。

附图说明

[14]. 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍。显而易见地，下面描述中的附图是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动性的前提下，还可以根据这些附图获得其它的附图。

[15]. 图 1 铜绿假单胞菌膜囊泡透射电镜图（A：对照组膜囊泡；B：辐照组膜囊泡；比例尺：200 nm）。

[16]. 图 2 铜绿假单胞菌膜囊泡内容物含量测定图。

[17]. 图 3 铜绿假单胞菌膜囊泡粒径分布图。

[18]. 图 4 金黄色葡萄球菌膜囊泡内容物含量测定图。

[19]. 图 5 辐照处理的膜囊泡促进骨髓来源树突状细胞表面分子 CD80、CD86 及 MHCII 分子显著上调。

[20]. 图 6 辐照处理的膜囊泡刺激后的 DC 细胞对抗原吞噬能力的柱状图。

[21]. 图 7 CD4⁺ T 细胞在与不同处理方式后的 DC 发生作用后的增殖百分比。

[22]. 图 8 CD4⁺ T 细胞在与不同处理方式后的 DC 发生作用后的增殖流式图。

[23]. 图 9 辐照处理的膜囊泡增强 DC 细胞与 T 细胞相互作用（GC: growth control, 树突状细胞生长对照组（未刺激组）；Cell+MVs（全菌体+囊泡处理组）；MVs（囊泡处理组））。

[24]. 图 10 细菌膜囊泡生产系统结构示意图。

[25]. 图 11 细菌膜囊泡纯化系统结构示意图。

[26]. 图 12 细菌膜囊泡分离系统结构示意图。

具体实施方式

[27]. 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[28]. 所举实施例是为了更好地对本发明进行说明，但并不是本发明的内容仅局限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整，仍属于本发明的保护范围。

[29]. 需要注意的是，本发明中的各个子发明（A 发明、B 发明、C 发明、D 发明和 E 发明）是可以组合在一起衍生出其它的技术方案、解决更多的技术问题、产生更多的技术效果的，因此本文中针对各个子发明的描述是可以互相印证、解释、说明、结合、组合、融合的。

[30]. 但是，针对本文中各个子发明的描述可能会涉及到一些相同或相似的用词，如果这些相同或相似的用词在理解和含义上产生冲突或者矛盾，那么以这些用词在各自所属于的子发明的描述部分的理解和含义为准。

A 发明：细菌膜囊泡及其制备方法与应用

[31]. A 发明属于微生物学领域，具体涉及一种细菌膜囊泡的制备分离纯化以及该膜囊泡的应用。

[32]. 现代工艺技术在生产制备及纯化细菌膜囊泡时存在以下问题：1) 利用抗生素、去污剂、氧化剂等手段虽然能促进膜囊泡产生，但也伴随着有毒残留问题，给其应用带来了不确定性。2) 上述干预因素刺激细菌产生膜囊泡的效率也相对较低，且该制备工艺不能实现标准化生产。3) 上述方法会使菌体本身的外膜抗原性、构象等可能发生变化，进而影响囊泡，限制其后续应用。

[33]. 鉴于此，A 发明提供了一种分离细菌 MVs 的方法，和一种制备细菌 MVs 的方法。本发明不添加化学刺激物质，因此无残留物引起不良作用，同时工艺流程简单、囊泡产量高，高效、放大效果好，可以用于囊泡的大量制备。制备的囊泡与正常囊泡相比具有较好的免疫原性，后续进一步的开发应用前景广阔。

[34]. A 发明的目的在于提供一种细菌膜囊泡。

[35]. 细菌产生的生物颗粒，所述生物颗粒是从灭活细菌中分离的膜

囊泡。

[36]. 进一步, 所述灭活细菌包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和基因工程改造菌。

[37]. 进一步, 所述革兰氏阳性菌包括金黄色葡萄球菌、链球菌、白喉杆菌、结核杆菌、破伤风杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌, 以及上述菌的基因工程改造菌。

[38]. 进一步, 所述革兰氏阴性菌包括铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、伤寒杆菌、脑膜炎双球菌、变形杆菌、志贺菌, 以及上述菌的基因工程改造菌。

[39]. 进一步, 所述灭活菌为厌氧菌。

[40]. 进一步, 所述厌氧菌包括幽门螺杆菌、反硝化细菌或核梭杆菌。

[41]. 一种生物组合物, 其特征在于, 含有上述膜囊泡和上述灭活细菌。

[42]. 进一步, 上述膜囊泡作为疫苗和/或疫苗佐剂和/或药物载体与上述灭活细菌组合。

[43]. A 发明的目的还在于提供一种膜囊泡的分离方法。

[44]. 一种从细菌中分离膜囊泡的方法, 所述细菌包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 具体包括以下步骤:

1) 将培养细菌的菌液中的菌体和培养液进行分离, 收集获得上清液 1,

2) 将所述上清液 1 用高速离心机离心, 收集上清液 2;

3) 将所述上清液 2 用超高速离心机离心, 沉淀为膜囊泡。

[45]. 进一步, 所述步骤 1) 中分离方法包括离心、过柱或膜包浓缩。

133. 进一步, 在所述步骤 2) 中收集获得的所述上清液 2 在进入所述步骤 3) 之前, 先经膜包浓缩。在一些实施例中, 所选择的膜包可以浓缩大于 100 KD 的物质。

[46]. 进一步, 将所述膜囊泡用缓冲液重悬, 所述缓冲液按 1 L 体积计算, 包括 50 mM Tris, 5 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 并且 pH 值为 7.4。

[47]. 一种制备生物组合物的方法, 收集上述分离膜囊泡方法中步骤 1) 分离的所述菌体, 将所述菌体与步骤 3) 所得的所述膜囊泡混合形成所述生物组合物。

[48]. 进一步, 所述步骤 1) 中, 将所述上清液 1 用 0.3-0.5 μ M 滤器过滤去杂质。

[49]. 优选的, 将所述上清液 1 用 0.45 μ M 滤器过滤去杂质。

[50]. 进一步, 所述步骤 1) 中的分离方法为离心, 所述离心的离心速率为 100-10000g; 离心时间为 10-60min。

[51]. 优选的, 步骤 1) 的离心的速率为 400-8000g; 离心时间为 10-30min。

[52]. 进一步, 所述步骤 2) 中的高速离心速率为 5000-25000g; 离心时间为 10-100min。

[53]. 优选的, 步骤 2) 中的高速离心速率为 10000-20000g; 离心时间为 30-60min。

[54]. 进一步, 所述步骤 3) 中的所述超高速离心速率为 5000-150000g; 离心时间为 60-600min。

[55]. 优选的, 步骤 3) 中的超高速离心速率为 15000-150000g; 离心时间为 60-180min。

[56]. 进一步, 所述革兰氏阳性菌包括金黄色葡萄球菌、链球菌、白喉杆菌、结核杆菌、破伤风杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌, 以及上述菌的基因工程改造菌。

[57]. 进一步, 所述革兰氏阴性菌包括铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、伤寒杆菌、脑膜炎双球菌、变形杆菌、志贺菌, 以及上述菌的基因工程改造菌。

[58]. 进一步, 所述细菌为灭活细菌。

[59]. 采用上述方法所得的膜囊泡。

[60]. 本发明的目的还在于提供一种制备方法。

[61]. 一种制备生物颗粒的方法, 其特征在于, 具体包括以下步骤:

1) 膜囊泡增量

培养细菌至对数生长期; 收集菌体, 将所述菌体重悬后用电离射线辐照处理, 得辐照细菌;

2) 分离纯化

用上述分离膜囊泡的方法进行分离, 得膜囊泡。

[62]. 进一步, 所述电离射线辐照处理的方式为 X-ray 射线, 辐照剂量为 500-3000Gy。所述辐照剂量具体包括: 500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy, 1000-1100 Gy, 1100-1200 Gy, 1200-1300 Gy, 1300-1400 Gy, 1400-1500 Gy, 1500-1600 Gy, 1600-1700 Gy, 1700-1800 Gy, 1800-1900 Gy, 1900-2000 Gy, 2100-2200 Gy, 2200-2300 Gy, 2300-2400 Gy, 2400-2500 Gy, 2500-2600 Gy, 2600-2700 Gy, 2700-2800 Gy, 2800-2900 Gy, 2900-3000 Gy。

[63]. 优选的, 所述辐照剂量为 500-1000Gy。所述辐照剂量具体包括: 500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy。

[64]. 进一步, 所述步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.3-0.8。

[65]. 优选的, 所述步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.5-0.7。

[66]. 进一步, 所述步骤 1) 中用磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬所述菌体。

- [67]. 优选的, 所述步骤 1) 中用磷酸盐缓冲液重悬所述菌体。
- [68]. 进一步, 所述步骤 1) 中将所述菌体重悬至 OD₆₀₀ 值为 20-80。
- [69]. 优选的, 所述步骤 1) 中将所述菌体重悬至 OD₆₀₀ 值为 40-60。
- [70]. 采用上述方法所得的膜囊泡。
- [71]. 上述方法制得的膜囊泡, 同未经电离射线辐照的细菌相比, 所述膜囊泡中核酸的含量和蛋白质的含量提升了 10-20 倍。
- [72]. 本发明的目的还在于提供膜囊泡及灭活菌的应用。
- [73]. 上述膜囊泡 (以下简称 A 发明制得的膜囊泡) 作为免疫原中的应用。
- [74]. A 发明制得的膜囊泡的膜囊泡作为免疫反应促进剂中的应用。
- [75]. A 发明制得的膜囊泡的膜囊泡作为治疗细菌感染疾病的疫苗中的应用。
- [76]. 进一步, 所述细菌感染疾病包括肺炎、泌尿道感染、脑膜炎、败血症, 或皮肤、软组织感染。
- [77]. A 发明制得的膜囊泡作为疫苗佐剂中的应用。
- [78]. 进一步, 所述疫苗佐剂为非特异性地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答。
- [79]. A 发明制得的膜囊泡作为抗原递呈细胞功能促进剂中的应用。
- [80]. 进一步, 抗原递呈细胞树突状细胞, 巨噬细胞, 及 B 细胞。
- [81]. 经过辐射再分离纯化得到的膜囊泡作为 DC 细胞成熟的促进剂中的应用。
- [82]. 进一步, 所述的膜囊泡作为促进骨髓来源树突状细胞表面分子 CD80、CD86 及 MHCII 分子显著上调的促进剂中的应用。
- [83]. A 发明制得的膜囊泡作为 DC 细胞抗原递呈能力促进剂中的应用。
- [84]. A 发明制得的膜囊泡联合 DC 细胞在制备 CD4+T 细胞的增殖剂中的应用。
- [85]. 促进 CD4+T 细胞增殖的方法, 将辐照处理制备的膜囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 CD4+T 淋巴细胞在体外共培养。
- [86]. A 发明制得的膜囊泡在制备兽药中的应用。
- [87]. A 发明所述的灭活细菌作为细菌疫苗的应用。
- [88]. **A 发明的实施例一**
- [89]. A 发明提供了一种分离制备细菌膜囊泡的方法, 所述方法包括如下步骤:
- [90]. 1. 培养细菌至对数生长期, 对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.3-0.8; 最好是选择 OD₆₀₀ 值为 0.5-0.8 (此处还可以进行发酵, 使菌体进一步富集); 收集菌体, 将所述菌体用适量的磷酸盐缓冲液重悬,

所加磷酸盐缓冲液的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD₆₀₀ 值 20-80；最好是选择 OD₆₀₀ 值为 40-60；重悬后用电离射线辐照处理，得辐照细菌；最好用 X-ray 射线辐照处理，辐照剂量为 500-3000Gy，具体包括：500-600 Gy，600-700 Gy，700-800 Gy，800-900 Gy，900-1000 Gy，1000-1100 Gy，1100-1200 Gy，1200-1300 Gy，1300-1400 Gy，1400-1500 Gy，1500-1600 Gy，1600-1700 Gy，1700-1800 Gy，1800-1900 Gy，1900-2000 Gy，2100-2200 Gy，2200-2300 Gy，2300-2400 Gy，2400-2500 Gy，2500-2600 Gy，2600-2700 Gy，2700-2800 Gy，2800-2900 Gy，2900-3000 Gy。

[91]. 2. 收集菌液，菌液离心并收集上清液，上清液用 0.5μM 滤器过滤除菌；离心速率为 400-8000g；离心时间为 10-30min。

[92]. 3. 将过滤后的上清液用高速离心机离心，收集上清液，去除鞭毛；高速离心速率为 10000-20000g；离心时间为 30-60min。

[93]. 4. 将去除鞭毛后的上清液用超高速离心机离心，沉淀膜囊泡；超高速离心速率为 15000-150000g；离心时间为 60-180min。

[94]. 5. 收集膜囊泡，得纯化后的膜囊泡。

[95]. A 发明的实施例二

[96]. 电离射线辐照铜绿假单胞杆菌 PAO1 制备、分离纯化膜囊泡：

[97]. 1. 从 -80℃ 复苏铜绿假单胞菌 PAO1 划线至 LB 平板，37℃ 培养箱培养 16-18 h。

[98]. 2. 从 LB 平板上挑取单克隆菌落接种于 20mL LB 液体培养基中，37℃，250 rpm 恒温培养 16-18 h。

[99]. 3. 取过夜菌液接种至 1L LB 培养基中，至起始浓度为 0.05 OD₆₀₀/mL，37℃ 250 rpm 培养至对数生长期，测 OD₆₀₀ 值。

[100]. 4. 将上述 3) 的菌液转移至离心桶中，5,000 g 离心 20min，收集菌体用生理盐水重悬，调整菌体浓度为 50OD 左右。

[101]. 5. 取上述菌液置于辐照仪中，辐照剂量为 1000Gy。

[102]. 6. 将辐照后的菌液 8,000×g，20min，离心两次，收集上清液；上清液用 0.45 μM 滤器过滤除菌再次收集得到的上清，同时取少量上清液涂在 LB 平板上，37℃ 培养 24-72h，以确认无活菌存在。

[103]. 7. 将步骤 6) 上清液高速离心机离心，除去上清液中的鞭毛。

[104]. 8. 将步骤 7) 上清液超高速离心机离心，沉淀膜囊泡。

[105]. 9. 弃去上清，沉淀用 MV buffer 重悬，-80℃ 保存。

[106]. 10. 将提取的正常组膜囊泡和本发明实验组膜囊泡进行透射电镜观察。同时测定提取的正常组膜囊泡和本发明实验组膜囊泡的内容物含量，包括测定其 DNA 含量、RNA 含量和蛋白质含量。最后再测量提取的正常组膜囊泡和本发明实验组膜囊泡粒径大小。

[107]. 实验结果:

[108]. 由电镜结果可知, 电离射线能够刺激绿脓杆菌 PAO1 产生膜囊泡, 实验组膜囊泡数量更多; 囊泡形态大小与正常对照组无明显差异。见图 1。

[109]. 内容物含量测定结果: 实验组制备的膜囊泡的核酸含量和蛋白质含量与正常对照组相比提高 10-20 倍。见图 2。具体测量数据见表 1。

[110]. 表 1 膜囊泡内容物含量测定

辐照剂量 Gy	DNA ng/ μ L	RNA ng/ μ L	蛋白 μ g/mL	内毒素 (EU/ml)
-	24.8	19.7	262.7	1.28×10^5
980	469.0	364.0	4551.0	1.07×10^6

[111]. 粒径分布图数据显示, 正常对照组和实验组制备的膜囊泡大小上无明显差别, 平均在 150nm 左右。见图 3; 具体测量数据见表 2。

[112]. 表 2 粒径

辐照剂量 Gy	平均粒径 (nm)	Peak(nm)
-	152.2	192.6
980	146.5	222.9

[113]. **A 发明的实施例三**

[114]. 电离射线辐照金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 制备膜囊泡:

[115]. 1. 从-80℃复苏金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 划线至 LB 平板, 37℃培养箱培养 16-18h。

[116]. 2. 从 LB 平板上挑取单克隆菌落接种于 100mL LB 液体培养基中, 37℃, 250rpm 恒温培养 16-18h。

[117]. 3. 取过夜菌液接种至 2L LB 培养基中, 至起始浓度为 0.05 OD₆₀₀/mL, 37℃, 250 rpm 培养至对数生长期, 测 OD₆₀₀ 值。

[118]. 4. 将上述 3) 菌液转移至 2 L 离心桶中, 5,000 g 离心 20min, 收集菌体用生理盐水重悬, 调整菌体浓度为 50OD 左右, 取 100 μ L 稀释 10^7 涂板计算活菌数。

[119]. 5. 取上述菌液置于辐照仪中, 辐照剂量为 1000Gy。

[120]. 6. 将辐照后的菌液 $8,000 \times g$, 20 min, 离心两次, 收集上清液; 上清液用 0.45 μ M 滤器过滤除菌再次收集得到的上清, 同时取少量上清液涂在 LB 平板上, 37℃培养 24-72h, 以确认无活菌存在。

[121]. 7. 将步骤 6) 上清液超高速离心机离心, $39,000 \times g$, 90min, 沉淀 MVs。

[122]. 8. 弃去上清, 沉淀用 2 mL MV buffer 重悬, -80℃保存。

[123]. 9. 测定提取的正常组膜囊泡和本发明实验组膜囊泡的内

容物含量,包括测定其 DNA 含量、RNA 含量和蛋白质含量。

[124]. 实验结果

[125]. 经测定结果表明,对于金黄色葡萄球菌 ATCC27853,实验组制备的膜囊泡的核酸含量和蛋白质含量明显提高,表明,电离射线辐照革兰氏阳性菌也能刺激膜囊泡的产生。见图 4。

[126]. **A 发明实施例四**

[127]. 辐照处理的细菌膜囊泡的免疫调节作用-促进树突状细胞成熟:

[128]. 树突状细胞(Dendritic Cells,DCs)是机体的主要的抗原递呈细胞,其主要功能是吞噬、处理加工抗原分子,并递呈给 T 细胞。是已知体内功能最强、唯一能活化静息 T 细胞的专职抗原提呈细胞,是启动、调控和维持免疫应答的中心环节。树突状细胞的成熟状况决定机体产生免疫应答或免疫耐受。DCs 表面的共刺激分子 B7 (B7-1=CD80 和 B7-2 =CD86)可以和 T 细胞表面的 CD28 或 CD152 分子结合,加强或者减弱 DCs 与 T 细胞之间 MHC-TCR 的信号传导。在成熟的 DCs 上主要表现为表明共刺激分子 CD80、CD86 表达变化,吞噬抗原能力减弱而处理递呈抗原能力增强(MHCII 分子表达增高),以及与 T 淋巴细胞的相互作用等。

[129]. 1. 小鼠骨髓来源树突状细胞(BMDC)细胞诱导培养:取 6-8 周 C57 雌性小鼠,无菌分离小鼠股骨,将股骨上的肌肉剔干净后剪开股骨两端,PBS 冲洗骨髓腔直至发白,将 PBS 悬液过滤后 1200rpm 离心 5min,去上清,加入 5ml 红细胞裂解液重悬细胞。静置 15min 后 1200 rpm 离心 5min,去上清,加入 50ml 1640 完全培养基(20ng/ml GM-CSF、10%FBS、50mM 2-巯基乙醇)重悬细胞。混匀后分至 5 个培养皿中置培养箱中培养,每 2 天换液,第 7 天收集细胞。

[130]. 2.BMDC 刺激:取诱导 7 天的 BMDC 细胞,6 孔板中反复吹打使贴壁细胞脱落,收集细胞悬液,1100 rpm 离心 5 min,去上清,加入 1 ml 培养基重悬细胞、活细胞计数,调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,接种 2ml 至新的 6 孔板。加入各刺激物并混匀,分别为:全菌,全菌+囊泡,囊泡,使得终浓度为 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ (以蛋白质为标准),继续培养 24 小时,生长对照组加入等体积的 PBS。

[131]. 3.流式检测成熟 marker: 24h 后取出 6 孔板,反复吹打细胞使其脱落,收集细胞悬液至流式管,1500 rpm 离心 3 min,去上清,加入 1 ml PBS 继续 1500 rpm 离心 3 min 后去上清,反复清洗 3 遍。加入 CD11c/CD80/CD86/MHCII 抗体室温避光孵育 30min,同时阴性对照组应设立一个同型对照组加入 CD11c/CD80/CD86/MHCII 的同行对照。孵育完成后加入 PBS 清洗 2 遍后加入 200 μl PBS 重悬细胞,上流式细胞仪检测。

[132]. 4.结果处理：流式细胞仪软件分析 CD11c 细胞中 CD80/CD86/MHCII 比例。

[133]. 实验结果：

[134]. 与全菌体相比，X 射线处理的实验组（MVs）囊泡能使刺激后 DCs 表面共刺激分子 CD80、CD86 和 MHCII 等显著上调，而这些表面分子是树突状细胞成熟的标志。综上证明囊泡能显著促进 DCs 的分化和成熟。见图 5。

[135]. **A 发明实施例五**

[136]. 通过检测 FITC 标记的葡聚糖荧光强度来检测 DC 细胞的吞噬能力：

[137]. DC 细胞具有极强的抗原内吞和加工处理能力。在未接触到抗原物质时处于非成熟状态，其吞噬能力强，在接触到抗原激活后变为成熟，其吞噬能力变弱，抗原提呈能力增强，本实验通过检测 FITC 标记的葡聚糖荧光强度来确定 DC 的吞噬葡聚糖的多少从而检测 DC 的吞噬能力是否增强。

[138]. 1.BMDC 细胞诱导培养（同上一实施例）。

[139]. 2.刺激：第 7 天收集细胞，将细胞全部吹下后离心重悬计数，然后接种到 6 孔板，每孔接种 1×10^6 个细胞，再分别加入刺激物，GC 组加入等体积的 PBS，Control 组及 Treatment 组加入相同浓度的膜囊泡（按蛋白质水平）后 37℃ 培养 24 h。

[140]. 3.吞噬与检测：加入葡聚糖（5μg/ml），继续培养 1 h 后，吸出细胞到流式管，PBS 洗涤 3 次后加入 CD11c 抗体室温避光孵育 30min，PBS 清洗 3 次后流式检测 FITC 荧光。

[141]. 4.结果处理：流式细胞仪软件分析 CD11c 细胞中 FITC 比例。

[142]. 实验数据：

[143]. 为了检测 DCs 的吞噬功能，我们采用 FITC-葡聚糖作为模式抗原供 DCs 吞噬，检测 CD11c+DCs 的 FITC 平均荧光强度值。实验结果显示，GC 组树突状细胞（生长对照组）基本没有 FITC-葡聚糖摄入，但是无论是 DCs 接受刺激后，FITC 平均荧光强度值相比于 GC 组明显降低。这个实验结果再次证明囊泡能够促进 DCs 成熟，从而降低对抗原的摄取能力。见图 6。

[144]. **A 发明实施例六**

[145]. X 射线处理组细菌膜囊泡刺激后的成熟 DC 与 T 细胞相互作用：

[146]. A. 成熟 DC 与 CD4+T 细胞相互作用：

[147]. DCs 对胞外蛋白有效的交叉抗原递呈在诱导特异性细胞免疫反应中具有重要作用。因此检测囊泡刺激后 DCs 对 OVA 抗原的交

叉递呈作用。在 DCs-T 细胞共培养后的 72h, 我们通过 CFSE 流式细胞术来检测 OT-II CD4+T 淋巴细胞的增殖情况。荧光染料 CFSE(CFDA-SE), 即羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂, 是一种可对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂。它进入细胞后可以不可逆地与细胞内的氨基结合偶联到细胞蛋白质上。在细胞分裂增殖过程中, CFSE 标记荧光可平均分配至两个子代细胞中, 其荧光强度是亲代细胞的一半。因此我们可以利用流式细胞术对 CFSE 荧光较弱的细胞百分比进行统计, 从而得到增殖细胞的比例。

[148]. 1. BMDC 细胞诱导培养 (同上实施例)。

[149]. 2. 抗原吞噬: 将培养 7 天的 DCs 在含 10 $\mu\text{g/ml}$ OVA 培养基中培养 24h 作为 GC (growth control, 生长对照组), MVs 组别另外加入囊泡, 接下来离心收集吞噬过抗原的 DCs 并重悬在正常培养基中, 以 2×10^4 细胞/孔的密度铺板于 96 孔板中, 每孔 100 μl , 每组 3 个复孔。

[150]. 3. T 细胞提取: 在第二天, OT-II 小鼠脾脏 OVA 特异性的 CD4+T 淋巴细胞使用 Stem Cell Technologies 公司的阴性磁珠筛选试剂盒分离富集。

[151]. 4. DC 与 T 细胞共培养: 对分选出的 CD4+T 细胞按照试剂盒说明书使用 1 μM CFSE 进行标记。标记后用 PBS 洗涤 3 次, 以 10^5 细胞/孔的密度加入到 96 孔板中, 使其培养终体积为 200 μl (CD4:DC=5:1)。

[152]. 5. 在共培养后的第 3 天, 利用流式细胞术通过 CFSE 递减来检测 CD4+T 细胞群的增殖情况。

[153]. 实验结果:

[154]. 将囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 OT-II 小鼠 CD4+T 淋巴细胞在体外共培养。流式分析 CFSE 荧光强度结果表明, 增殖 CD4+T 细胞的比例增加。囊泡 (14.05%) 能显著增加吞噬 OVA 抗原的 DCs (6.80%) 对于特异性 CD4+T 细胞的促进增殖作用。详见图 7、图 8。

[155]. B. 囊泡处理后的 DC 促进 T 细胞增殖:

[156]. DCs 对胞外蛋白有效的交叉抗原递呈在诱导特异性细胞免疫反应中具有重要作用。因此检测囊泡刺激后 DCs 对 OVA 抗原的交叉递呈作用。在 DCs-T 细胞共培养后的 72h, 我们通过 CFSE 流式细胞术来检测 T 淋巴细胞的增殖情况。荧光染料 CFSE(CFDA-SE), 即羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂, 是一种可对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂。它进入细胞后可以不可逆地与细胞内的氨基结合偶联到细胞蛋白质上。在细胞分裂增殖过程中, CFSE 标记荧光可平均分配至两个子代细胞中, 其荧光强度是亲代细胞的一半。因此我们可

以利用流式细胞术对 CFSE 荧光较弱的细胞百分比进行统计，从而得到增殖细胞的比例。

[157]. 1. BMDC 细胞诱导培养（同上实施例）。

[158]. 2. 抗原吞噬：将培养 7 天的 DCs 在培养基中培养 24h 作为 GC（growth control，生长对照组），MVs 组别另外加入囊泡，接下来离心收集吞噬过抗原的 DCs 并重悬在正常培养基中，以 4×10^4 细胞/孔的密度铺板于 96 孔板中，每孔 100 μ l，每组 3 个复孔。

[159]. 3. T 细胞提取：在第二天，使用 MVs 免疫一次后一周的小鼠脾脏 Stem Cell Technologies 公司的阴性磁珠筛选试剂盒分离富集小鼠的 T 细胞。

[160]. 4. DC 与 T 细胞共培养：对分选出的 T 细胞按照试剂盒说明书使用 1 μ M CFSE 进行标记。标记后用 PBS 洗涤 3 次，以 4×10^5 细胞/孔的密度加入到 96 孔板中，使其培养终体积为 200 μ l（CD3:DC=10:1）。

[161]. 5. 在共培养后的第 3 天，利用流式细胞术通过 CFSE 递减来检测 CD3⁺，CD8⁺，CD4⁺T 细胞群的增殖情况。

[162]. 实验结果：

[163]. 将囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 OT-II 小鼠 CD4⁺T 淋巴细胞在体外共培养。流式分析 CFSE 荧光强度结果表明，增殖 CD4⁺T 细胞的比例增加。如图所示，菌体加囊泡刺激组荧光强度为 63.5%，囊泡刺激组为 71%。说明，囊泡处理后 DCs，能显著刺激 CD4⁺T 细胞的增殖。见图 9。

B 发明：铜绿假单胞菌膜囊泡及其制备方法与应用

[164]. B 发明属于微生物学领域，具体涉及一种铜绿假单胞菌膜囊泡的制备分离纯化以及该膜囊泡的应用。

[165]. 现代工艺技术在生产制备及纯化细菌膜囊泡时存在以下问题：1）利用抗生素、去污剂、氧化剂等手段虽然能促进膜囊泡产生，但也伴随着有毒残留问题，给其应用带来了不确定性。2）上述干预因素刺激细菌产生膜囊泡的效率也相对较低，且该制备工艺不能实现标准化生产。3）上述方法会使菌体本身的外膜抗原性、构象等可能发生变化，进而影响囊泡，限制其后续应用。

[166]. B 发明提供了一种分离铜绿假单胞菌 MVs 的方法，和一种制备铜绿假单胞菌 MVs 的方法。本发明采用国际领先的工艺技术，不添加化学刺激物质，因此无不良作用，同时工艺流程简单、囊泡产量高，高效、放大效果好，可以用于囊泡的大量制备。制备的囊泡与正常囊泡相比具有较好的免疫原性，后续进一步的开发应用前景广阔。

[167]. B 发明的目的在于提供一种铜绿假单胞菌疫苗。

[168]. 铜绿假单胞菌疫苗，所述铜绿假单胞菌疫苗含有从灭活铜绿假单胞菌中分离的膜囊泡。

[169]. 一种生物组合物，含有被分离的膜囊泡和灭活铜绿假单胞菌。

[170]. 进一步，所述膜囊泡作为疫苗和/或疫苗佐剂和/或药物载体与灭活铜绿假单胞菌组合。

[171]. B 发明的目的还在于提供一种分离铜绿假单胞菌膜囊泡的方法。

[172]. 一种从铜绿假单胞菌中分离膜囊泡的方法，包括如下步骤：

- 1) 培养细菌至对数生长期然后发酵；
- 2) 收集菌液，菌液离心并取上清液 1，所述上清液 1 用 0.3-0.5 μM 滤器过滤除菌；
- 3) 将过滤后的所述上清液 1 用高速离心机离心，收集上清液 2，去除鞭毛；
- 4) 将去除鞭毛后的所述上清液 2 用超高速离心机离心，沉淀即得到膜囊泡。

[173]. 进一步，步骤 2) 的上清液用 0.45 μM 滤器过滤除菌。

[174]. 进一步，步骤 2) 的离心速率为 100-10000g；离心时间为 10-60min。

[175]. 优选的，所述离心速率为 400-8000g；离心时间为 10-30min。

[176]. 进一步，步骤 3) 的高速离心速率为 5000-25000g；离心时间为 10-100min。

[177]. 优选的，所述的高速离心速率为 10000-20000g；离心时间为 30-60min。

[178]. 进一步，步骤 4) 的超高速离心速率为 5000-150000g；离心时间为 60-600min。

[179]. 优选的，所述的超高速离心速率为 15000-150000g；离心时间为 60-180min。

[180]. 进一步，所述铜绿假单胞菌为灭活的铜绿假单胞菌。

[181]. 采用上述分离方法得到的铜绿假单胞菌膜囊泡。

[182]. B 发明的目的还在于提供一种制备方法。

[183]. 制备上述铜绿假单胞菌疫苗的方法，所述方法包括如下步骤：

- 1) 培养细菌至对数生长期（此处也可以进行发酵，使菌体进一步富集）；
- 2) 收集菌体，将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬并用电离射线辐照处理；

3) 收集辐照处理后的菌液, 离心并取上清液 1, 所述上清液 1 用 0.3-0.5 μ M 滤器过滤除菌;

4) 将过滤后的所述上清液 1 用高速离心机离心, 收集上清液 2, 去除鞭毛;

5) 将去除鞭毛后的所述上清液 2 超高速离心, 沉淀即得膜囊泡。

[184]. 进一步, 步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.3-0.8。

[185]. 进一步, 其特征在于, 步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD₆₀₀ 值 20-80。

[186]. 进一步, 步骤 3) 中辐照处理用的射线为 X-ray 射线; 辐照剂量为 500-3000Gy。所述辐照剂量具体包括: 500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy, 1000-1100 Gy, 1100-1200 Gy, 1200-1300 Gy, 1300-1400 Gy, 1400-1500 Gy, 1500-1600 Gy, 1600-1700 Gy, 1700-1800 Gy, 1800-1900 Gy, 1900-2000 Gy, 2100-2200 Gy, 2200-2300 Gy, 2300-2400 Gy, 2400-2500 Gy, 2500-2600 Gy, 2600-2700 Gy, 2700-2800 Gy, 2800-2900 Gy, 2900-3000 Gy。

[187]. 优选的, 辐照剂量为 500-1000Gy。所述辐照剂量具体包括: 500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy。

[188]. 进一步, 步骤 3) 中的离心速率为 100-10000g; 离心时间为 10-60min。

[189]. 优选的, 所述离心速率为 400-8000g; 离心时间为 10-30min。

[190]. 进一步, 步骤 3) 中上清液用 0.45 μ M 滤器过滤除菌。

[191]. 进一步, 步骤 4) 中所述的高速离心速率为 5000-25000g; 离心时间为 10-100min。

[192]. 优选的, 所述高速离心速率为 10000-20000g; 离心时间为 30-60min。

[193]. 进一步, 步骤 5) 中所述的超高速离心速率为 5000-150000g; 离心时间为 60-600min。

[194]. 优选的, 所述的超高速离心速率为 15000-150000g; 离心时间为 60-180min。

[195]. 采用上述方法制得得到的铜绿假单胞菌膜囊泡和疫苗。

[196]. 进一步, 上述铜绿假单胞菌膜囊泡同未经电离射线辐照的细菌膜囊泡相比, 所述膜囊泡中核酸的含量和蛋白质的含量提升了 10-20 倍。

[197]. 一种提高铜绿假单胞菌膜囊泡内容物含量的方法, 所述内容物包括核酸和蛋白质, 所述方法采用辐照设备处理铜绿假单胞菌菌液, 所述辐照设备的射线为 X-ray 射线, 辐照剂量为 500-1000Gy。

[198]. B 发明的目的还在于提供一种所述铜绿假单胞菌膜囊泡和灭活铜绿假单胞菌的应用。

[199]. B 发明制得的铜绿假单胞菌膜囊泡（以下均简称 B 发明制得的铜绿假单胞菌膜囊泡）在制备抗细菌感染疫苗中的应用，所述铜绿假单胞菌膜囊泡可作为疫苗的佐剂使用。

[200]. 进一步，所述疫苗佐剂可以非特异性地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答。

[201]. 进一步，所述细菌感染疾病包括肺炎、泌尿道感染、脑膜炎、败血症，或皮肤、软组织感染。

[202]. 进一步，所述铜绿假单胞菌膜囊泡还可作为疫苗的载体应用。

[203]. B 发明制得的铜绿假单胞菌膜囊泡作为免疫原的应用。

[204]. B 发明制得的铜绿假单胞菌膜囊泡作为抗原递呈细胞功能促进剂中的应用。

[205]. 进一步，抗原递呈细胞包括树突状细胞，巨噬细胞，及 B 细胞。

[206]. 经辐照制备的铜绿假单胞菌膜囊泡在制备 DC 细胞生长促进剂中的应用，所述铜绿假单胞菌膜囊泡能刺激 DC 细胞表面共刺激分子 CD80、CD86 和 MHCII 显著上调，促进 DC 细胞成熟和分化。

[207]. B 发明制得的铜绿假单胞菌膜囊泡作为 DC 细胞抗原递呈能力促进剂中的应用。

[208]. 一种促进 CD4⁺T 细胞增值的方法，将经辐照制备的铜绿假单胞菌膜囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 CD4⁺T 淋巴细胞在体外共培养。

[209]. B 发明制得的铜绿假单胞菌膜囊泡在制备兽药中的应用。

[210]. B 发明所述的灭活铜绿假单胞菌作为细菌疫苗的应用。

[211]. B 发明的实施例一

[212]. B 发明提供了一种分离制备铜绿假单胞菌膜囊泡的系统，所述系统依次设有发酵罐、辐照设备、紫外分光光度设备和离心设备；所述辐照设备的射线发生器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器，或 Co⁶⁰ 同位素发生器中的一种或几种；所述离心设备包括离心机、高速离心机、超高速离心机中的一种或多种，见图 10。

[213]. B 发明的实施例二

[214]. B 发明提供了一种制备铜绿假单胞菌膜囊泡的方法，所述方法包括如下步骤：

1) 培养细菌至对数生长期，对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.3-0.8；最好是选择 OD₆₀₀ 值为 0.5-0.8（此处，还可以进行发酵，使菌体进一

步富集);

2) 收集菌体, 将菌体用适量的磷酸盐缓冲液重悬并用电离射线辐照处理; 所加磷酸盐缓冲液的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD₆₀₀ 值 20-80; 最好是选择 OD₆₀₀ 值为 40-60;

3) 用 X-ray 射线辐照处理, 辐照剂量为 500-3000Gy, 具体包括: 500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy, 1000-1100 Gy, 1100-1200 Gy, 1200-1300 Gy, 1300-1400 Gy, 1400-1500 Gy, 1500-1600 Gy, 1600-1700 Gy, 1700-1800 Gy, 1800-1900 Gy, 1900-2000 Gy, 2100-2200 Gy, 2200-2300 Gy, 2300-2400 Gy, 2400-2500 Gy, 2500-2600 Gy, 2600-2700 Gy, 2700-2800 Gy, 2800-2900 Gy, 2900-3000 Gy;

4) 将辐照后菌液离心, 离心速率为 100-10,000g; 离心时间为 10-60min。上清液用高速离心机再离心, 收集上清液, 去除鞭毛; 高速离心速率为 5000-25000g; 离心时间为 10-100min;

5) 将去除鞭毛后的上清超高速离心, 沉淀膜囊泡; 超高速离心速率为 5000-150000g; 离心时间为 60-600min;

7) 收集膜囊泡。

[215]. B 发明的实施例三

[216]. B 发明提供了一种分离纯化铜绿假单胞菌膜囊泡的方法, 所述方法包括如下步骤:

1) 培养细菌至对数生长期;

2) 收集菌液, 菌液离心并弃上清液, 上清液用 0.45 μ M 滤器过滤除菌; 离心率为 400-8000g; 离心时间为 10-30min;

3) 将过滤后的上清液用高速离心机离心, 收集上清液, 去除鞭毛; 高速离心速率为 10000-20000g; 离心时间为 30-60min;

4) 将去除鞭毛后的上清液用超高速离心机离心, 沉淀膜囊泡; 超高速离心速率为 15000-150000g; 离心时间为 60-180min;

5) 收集膜囊泡

[217]. B 发明实施例四

[218]. 电离射线辐照铜绿假单胞杆菌 PAO1 制备、分离纯化膜囊泡:

[219]. 1. 从-80 $^{\circ}$ C复苏铜绿假单胞菌 PAO1 划线至 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 16-18 h。

[220]. 2. 从 LB 平板上挑取单克隆菌落接种于 20mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 250 rpm 恒温培养 16-18 h。

[221]. 3. 取过夜菌液接种至 1L LB 培养基中, 至起始浓度为 0.05 OD₆₀₀/mL, 37 $^{\circ}$ C 250 rpm 培养至对数生长期, 测 OD₆₀₀ 值。

[222]. 4. 将上述 3) 的菌液转移至离心桶中, 5,000 g 离心 20min,

收集菌体用生理盐水重悬，调整菌体浓度为 50OD 左右。

[223]. 5. 取上述菌液置于辐照仪中，辐照剂量为 1000Gy。

[224]. 6. 将辐照后的菌液 $8,000\times g$, 20min, 离心两次，收集上清液；上清液用 0.45 μM 滤器过滤除菌再次收集得到的上清，同时取少量上清液涂在 LB 平板上，37℃培养 24-72h，以确认无活菌存在。

[225]. 7. 将步骤 6) 上清液高速离心机离心，除去上清液中的鞭毛。

[226]. 8. 将步骤 7) 上清液超高速离心机离心，沉淀膜囊泡。

[227]. 9. 弃去上清，沉淀用 MV buffer 重悬，-80℃保存。

[228]. 10. 将提取的正常组膜囊泡和本发明实验组膜囊泡进行透射电镜观察。同时测定提取的正常组膜囊泡和本发明实验组膜囊泡的内容物含量，包括测定其 DNA 含量、RNA 含量和蛋白质含量。最后再测量提取的正常组膜囊泡和本发明实验组膜囊泡粒径大小。

[229]. 实验结果：

[230]. 由电镜结果可知，电离射线能够刺激绿脓杆菌 PAO1 产生膜囊泡，实验组膜囊泡数量更多；囊泡形态大小与正常对照组无明显差异。见图 1。

[231]. 内容物含量测定结果：实验组制备的膜囊泡的核酸含量和蛋白质含量与正常对照组相比提高 10-20 倍。见图 2。具体测量数据见表 1。

[232]. B 发明实施例五

[233]. 辐照处理的细菌膜囊泡的免疫调节作用-促进树突状细胞成熟：

[234]. 1. 小鼠骨髓来源树突状细胞 (BMDC) 细胞诱导培养：取 6-8 周 C57 雌性小鼠，无菌分离小鼠股骨，将股骨上的肌肉剔干净后剪开股骨两端，PBS 冲洗骨管腔直至发白，将 PBS 悬液过滤后 1200rpm 离 5min，去上清，加入 5ml 红细胞裂解液重悬细胞。静置 15min 后 1200 rpm 离心 5min，去上清，加入 50ml 1640 完全培养基 (20ng/ml GM-CSF、10%FBS、50mM 2-巯基乙醇) 重悬细胞。混匀后分至 5 个培养皿中置培养箱中培养，每 2 天换液，第 7 天收集细胞。

[235]. 2. BMDC 刺激：取诱导 7 天的 BMDC 细胞，6 孔板中反复吹打使贴壁细胞脱落，收集细胞悬液，1100 rpm 离心 5 min，去上清，加入 1 ml 培养基重悬细胞、活细胞计数，调整细胞浓度至 $1\times 10^6/\text{ml}$ ，接种 2ml 至新的 6 孔板。加入各刺激物并混匀，分别为：全菌，全菌+囊泡，囊泡，使得终浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (以蛋白质为标准)，继续培养 24 小时，生长对照组加入等体积的 PBS。

[236]. 3. 流式检测成熟 marker：24h 后取出 6 孔板，反复吹打细胞使其脱落，收集细胞悬液至流式管，1500 rpm 离心 3 min，去上清，

加入 1 ml PBS 继续 1500 rpm 离心 3 min 后去上清，反复清洗 3 遍。加入 CD11c/CD80/CD86/MHCII 抗体室温避光孵育 30min，同时阴性对照组应设立一个同型对照组加入 CD11c/CD80/CD86/MHCII 的同行对照。孵育完成后加入 PBS 清洗 2 遍后加入 200 μ l PBS 重悬细胞，上流式细胞仪检测。

[237]. 4.结果处理：流式细胞仪软件分析 CD11c 细胞中 CD80/CD86/MHCII 比例。

[238]. 实验结果：

[239]. 与全菌体相比，X 射线处理的实验组（MV）囊泡能使刺激后 DCs 表面共刺激分子 CD80、CD86 和 MHCII 等显著上调，而这些表面分子是树突状细胞成熟的标志。综上证明囊泡能显著促进 DCs 的分化和成熟。见图 5。

[240]. **B 发明实施例六**

[241]. 通过检测 FITC 标记的葡聚糖荧光强度来检测 DC 细胞的吞噬能力：

[242]. 1.BMDC 细胞诱导培养。

[243]. 2.刺激：第 7 天收集细胞，将细胞全部吹下后离心重悬计数，然后接种到 6 孔板，每孔接种 1×10^6 个细胞，再分别加入刺激物，GC 组加入等体积的 PBS，Control 组及 Treatment 组加入相同浓度的膜囊泡（按蛋白质水平）后 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。

[244]. 3.吞噬与检测：加入葡聚糖（5 μ g/ml），继续培养 1 h 后，吸出细胞到流式管，PBS 洗涤 3 次后加入 CD11c 抗体室温避光孵育 30min，PBS 清洗 3 次后流式检测 FITC 荧光。

[245]. 4.结果处理：流式细胞仪软件分析 CD11c 细胞中 FITC 比例。

[246]. 实验结果：

[247]. 为了检测 DCs 的吞噬功能，我们采用 FITC-葡聚糖作为模式抗原供 DCs 吞噬，检测 CD11c+DCs 的 FITC 平均荧光强度值。实验结果显示，GC 组树突状细胞（生长对照组）基本没有 FITC-葡聚糖摄入，但是无论是 DCs 接受刺激后，FITC 平均荧光强度值相比于 GC 组明显降低。这个实验结果再次证明囊泡能够促进 DCs 成熟，从而降低对抗原的摄取能力。见图 6。

[248]. **B 发明实施例七**

[249]. X 射线处理组细菌膜囊泡刺激后的成熟 DC 与 T 细胞相互作用：

[250]. A、成熟 DC 与 CD4+T 细胞相互作用：

[251]. 1. BMDC 细胞诱导培养。

[252]. 2.抗原吞噬：将培养 7 天的 DCs 在含 10 μ g/ml OVA 培养基

中培养 24h 作为 GC (growth control, 生长对照组), MVs 组别另外加入囊泡, 接下来离心收集吞噬过抗原的 DCs 并重悬在正常培养基中, 以 2×10^4 细胞/孔的密度铺板于 96 孔板中, 每孔 100 μ l, 每组 3 个复孔。

[253]. 3.T 细胞提取: 在第二天, OT-II 小鼠脾脏 OVA 特异性的 CD4+T 淋巴细胞使用 Stem Cell Technologies 公司的阴性磁珠筛选试剂盒分离富集。

[254]. 4.DC 与 T 细胞共培养: 对分选出的 CD4+T 细胞按照试剂盒说明书使用 1 μ M CFSE 进行标记。标记后用 PBS 洗涤 3 次, 以 10^5 细胞/孔的密度加入到 96 孔板中, 使其培养终体积为 200 μ l (CD4:DC=5:1)。

[255]. 5. 在共培养后的第 3 天, 利用流式细胞术通过 CFSE 递减来检测 CD4+T 细胞群的增殖情况。

[256]. 实验结果:

[257]. 将囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 OT-II 小鼠 CD4+T 淋巴细胞在体外共培养。流式分析 CFSE 荧光强度结果表明, 增殖 CD4+T 细胞的比例增加。囊泡 (14.05%) 能显著增加吞噬 OVA 抗原的 DCs (6.80%) 对于特异性 CD4+T 细胞的促进增殖作用。详见图 7、图 8。

[258]. B、囊泡处理后的 DC 促进 T 细胞增殖:

[259]. 1. BMDC 细胞诱导培养。

[260]. 2. 抗原吞噬: 将培养 7 天的 DCs 在培养基中培养 24h 作为 GC (growth control, 生长对照组), MVs 组别另外加入囊泡, 接下来离心收集吞噬过抗原的 DCs 并重悬在正常培养基中, 以 4×10^4 细胞/孔的密度铺板于 96 孔板中, 每孔 100 μ l, 每组 3 个复孔。

[261]. 3.T 细胞提取: 在第二天, 使用 MVs 免疫一次后一周的小鼠脾脏 Stem Cell Technologies 公司的阴性磁珠筛选试剂盒分离富集小鼠的 T 细胞。

[262]. 4.DC 与 T 细胞共培养: 对分选出的 T 细胞按照试剂盒说明书使用 1 μ M CFSE 进行标记。标记后用 PBS 洗涤 3 次, 以 4×10^5 细胞/孔的密度加入到 96 孔板中, 使其培养终体积为 200 μ l (CD3:DC=10:1)。

[263]. 5. 在共培养后的第 3 天, 利用流式细胞术通过 CFSE 递减来检测 CD3+, CD8+, CD4+T 细胞群的增殖情况。

[264]. 实验结果:

[265]. 将囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 OT-II 小鼠 CD4+T 淋巴细胞在体外共培养。流式分析 CFSE 荧光强度结果表明, 增殖 CD4+T 细胞的比例增加。如图所示, 菌体加囊泡刺激组

荧光强度为 63.5%，囊泡刺激组为 71%。说明，囊泡处理后 DCs，能显著刺激 CD4⁺T 细胞的增殖。见图 9。

C 发明：金黄色葡萄球菌膜囊泡及其制备方法与应用

[266]. C 发明属于微生物学领域，具体涉及一种金黄色葡萄球菌膜囊泡的制备分离纯化以及该膜囊泡的应用。

[267]. 现代工艺技术在生产制备及纯化细菌膜囊泡时存在以下问题：1) 利用抗生素、去污剂、氧化剂等手段虽然能促进膜囊泡产生，但也伴随着有毒残留问题，给其应用带来了不确定性。2) 上述干预因素刺激细菌产生膜囊泡的效率也相对较低，且该制备工艺不能实现标准化生产。3) 上述方法会使菌体本身的外膜抗原性、构象等可能发生变化，进而影响囊泡，限制其后续应用。

[268]. C 发明提供了一种分离金黄色葡萄球菌 MVs 的方法，和一种制备金黄色葡萄球菌 MVs 的方法。本发明采用国际领先的工艺技术，不添加化学刺激物质，因此无不良作用，同时工艺流程简单、囊泡产量高，高效、放大效果好，可以用于囊泡的大量制备。制备的囊泡与正常囊泡相比具有较好的免疫原性，后续进一步的开发应用前景广阔。

[269]. C 发明的目的在于提供一种金黄色葡萄球菌膜囊泡。

[270]. 金黄色葡萄球菌产生的生物颗粒，所述生物颗粒是从灭活金黄色葡萄球菌中分离的膜囊泡。

[271]. 含有上述生物颗粒的灭活金黄色葡萄球菌。

[272]. 进一步，所述灭活金黄色葡萄球菌与所述作用疫苗和/或疫苗佐剂和/或药物载体的生物颗粒组合。

[273]. C 发明的目的还在于提供一种分离金黄色葡萄球菌膜囊泡的方法。

[274]. 一种从金黄色葡萄球菌中分离膜囊泡的方法，包括如下步骤：

- 1) 培养细菌至对数生长期；
- 2) 收集菌液，菌液离心并取上清液 1，上清液 1 用 0.3-0.5 μ M 滤器过滤除菌；
- 3) 将过滤后的上清液 1 用高速离心机离心，收集上清液 2；
- 4) 将去除鞭毛后的上清液 2 用超高速离心机离心，沉淀即得到膜囊泡。

[275]. 进一步，步骤 2) 的上清液用 0.45 μ M 滤器过滤除菌。

[276]. 进一步，步骤 2) 的离心速率为 100-10000g；离心时间为 10-60min。

[277]. 优选的，所述离心速率为 400-8000g；离心时间为 10-30min。

[278]. 进一步, 步骤 3) 的高速离心速率为 5000-25000g; 离心时间为 10-100min。

[279]. 优选的, 所述的高速离心速率为 10000-20000g; 离心时间为 30-60min。

[280]. 进一步, 步骤 4) 的超高速离心速率为 5000-150000g; 离心时间为 60-600min。

[281]. 优选的, 所述的超高速离心速率为 15000-150000g; 离心时间为 60-180min。

[282]. 进一步, 所述金黄色葡萄球菌为灭活的金黄色葡萄球菌。

[283]. 采用上述分离方法得到的金黄色葡萄球菌膜囊泡。

[284]. C 发明的目的还在于提供一种制备方法。

[285]. 制备上述生物颗粒的方法, 所述方法包括如下步骤:

- 1) 培养细菌至对数生长期;
- 2) 收集菌体, 将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬并用电离射线辐照处理;
- 3) 收集辐照处理后的菌液, 离心并取上清液1, 上清液1用0.3-0.5 μ M 滤器过滤除菌;
- 4) 将过滤后的上清液1用高速离心机离心, 收集上清液2;
- 5) 将上清2超高速离心, 沉淀即得膜囊泡。

[286]. 进一步, 步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.3-0.8。

[287]. 进一步, 其特征在于, 步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD₆₀₀ 值 20-80。

[288]. 进一步, 步骤 2) 中辐照处理用的射线为 X-ray 射线; 辐照剂量为 500-3000Gy。所述辐照剂量具体包括: 500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy, 1000-1100 Gy, 1100-1200 Gy, 1200-1300 Gy, 1300-1400 Gy, 1400-1500 Gy, 1500-1600 Gy, 1600-1700 Gy, 1700-1800 Gy, 1800-1900 Gy, 1900-2000 Gy, 2100-2200 Gy, 2200-2300 Gy, 2300-2400 Gy, 2400-2500 Gy, 2500-2600 Gy, 2600-2700 Gy, 2700-2800 Gy, 2800-2900 Gy, 2900-3000 Gy。

[289]. 优选的, 辐照剂量为 500-1000Gy。所述辐照剂量具体包括: 500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy。

[290]. 进一步, 步骤 3) 中的离心速率为 100-10000g; 离心时间为 10-60min。

[291]. 优选的, 所述离心速率为 400-8000g; 离心时间为 10-30min。

[292]. 进一步, 步骤 3) 中上清液用 0.45 μ M 滤器过滤除菌。

[293]. 进一步, 步骤 4) 中所述的高速离心速率为 5000-25000g;

离心时间为 10-100min。

[294]. 优选的,所述高速离心速率为 10000-20000g;离心时间为 30-60min。

[295]. 进一步,步骤 5)中所述的超高速离心速率为 5000-150000g;离心时间为 60-600min。

[296]. 优选的,所述的超高速离心速率为 15000-150000g;离心时间为 60-180min。

[297]. 采用上述方法制得得到的金黄色葡萄球菌膜囊泡。

一种提高金黄色葡萄球菌膜囊泡内容物含量的方法,所述内容物包括核酸和蛋白质,所述方法采用辐照设备处理金黄色葡萄球菌菌液,所述辐照设备的射线为 X-ray 射线,辐照剂量为 500-1000Gy。

[298]. C 发明的目的还在于提供所述金黄色葡萄球菌膜囊泡及灭活菌的应用。

[299]. C 发明制得的金黄色葡萄球菌膜囊泡(以下均简称 C 发明制得的金黄色葡萄球菌膜囊泡)在制备抗细菌感染疫苗中的应用,所述金黄色葡萄球菌膜囊泡可作为疫苗的佐剂使用。

[300]. 进一步,所述疫苗佐剂可以非特异性地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答。

[301]. 进一步,所述细菌感染疾病包括肺炎、泌尿道感染、脑膜炎、败血症,或皮肤、软组织感染。

[302]. 进一步,所述金黄色葡萄球菌膜囊泡还可作为疫苗的载体应用。

[303]. C 发明制得的金黄色葡萄球菌膜囊泡作为免疫原的应用。

[304]. C 发明制得的金黄色葡萄球菌膜囊泡作为抗原递呈细胞功能促进剂中的应用。

[305]. 进一步,抗原递呈细胞包括树突状细胞,巨噬细胞,及 B 细胞。

[306]. 经辐照制备的金黄色葡萄球菌膜囊泡在制备 DC 细胞生长促进剂中的应用,所述金黄色葡萄球菌膜囊泡能刺激 DC 细胞表面共刺激分子 CD80、CD86 和 MHCII 显著上调,促进 DC 细胞成熟和分化。

[307]. C 发明制得的金黄色葡萄球菌膜囊泡作为 DC 细胞抗原递呈能力促进剂中的应用。

[308]. 一种促进 CD4 和 T 细胞增殖的组合物,所述组合物包含上述的金黄色葡萄球菌膜囊泡和 DC 细胞。

[309]. 一种促进 CD4+T 细胞增值的方法,将经辐照制备的金黄色葡萄球菌膜囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 CD4+T 淋巴细胞在体外共培养。

[310]. C 发明制得的金黄色葡萄球菌膜囊泡在制备兽药中的应用。

[311]. C 发明所述的灭活金黄色葡萄球菌作为细菌疫苗的应用。

[312]. **C 发明实施例一**

[313]. C 发明提供了一种分离制备金黄色葡萄球菌膜囊泡的系统，所述系统依次设有发酵罐、辐照设备、紫外分光光度设备和离心设备；所述辐照设备的射线发生器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器，或 Co^{60} 同位素发生器中的一种或几种；所述离心设备包括离心机、高速离心机、超高速离心机中的一种或多种，见图 10。

[314]. **C 发明实施例二**

[315]. C 发明提供了一种制备金黄色葡萄球菌膜囊泡的方法，所述方法包括如下步骤：

- 1) 培养细菌至对数生长期，所述对数生长期的细菌的 OD_{600} 值为 0.3-0.8（此处还可以对细菌进行发酵，使菌体进一步富集）；
- 2) 收集菌体，将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬，优先选用无菌生理盐水，且所加生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD_{600} 值 20-80；
- 3) 用 X-ray 射线辐照处理，辐照剂量为 500-3000Gy，具体包括：500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy, 1000-1100 Gy, 1100-1200 Gy, 1200-1300 Gy, 1300-1400 Gy, 1400-1500 Gy, 1500-1600 Gy, 1600-1700 Gy, 1700-1800 Gy, 1800-1900 Gy, 1900-2000 Gy, 2100-2200 Gy, 2200-2300 Gy, 2300-2400 Gy, 2400-2500 Gy, 2500-2600 Gy, 2600-2700 Gy, 2700-2800 Gy, 2800-2900 Gy, 2900-3000 Gy；
- 4) 将辐照后菌液离心，离心速率为 100-10000g；离心时间为 10-60min。上清液用高速离心机再离心，收集上清液；高速离心速率为 5000-25000g；离心时间为 10-100min；
- 5) 将上清超高速离心，沉淀膜囊泡；超高速离心速率为 5000-150000g；离心时间为 60-600min。
- 7) 收集膜囊泡。

[316]. **C 发明实施例三**

[317]. C 发明提供了一种分离金黄色葡萄球菌膜囊泡的方法，所述方法包括如下步骤：

- 1) 培养细菌至对数生长期然后发酵；
- 2) 收集菌液，菌液离心并弃上清液，上清液用 0.3-0.5 μM 滤器过滤除菌；离心速率为 400-8000g；离心时间为 10-30min；
- 3) 将过滤后的上清液用高速离心机离心，收集上清液；高速离心速率为 10000-20000g；离心时间为 30-60min；

4) 将上清液用超高速离心机离心, 沉淀膜囊泡; 超高速离心速率为 15000-150000g; 离心时间为 60-180min;

5) 收集膜囊泡。

[318]. **C 发明实施例四**

[319]. 电离射线辐照金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 制备膜囊泡:

[320]. 1. 从-80℃复苏金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 划线至 LB 平板, 37℃培养箱培养 16-18h。

[321]. 2. 从 LB 平板上挑取单克隆菌落接种于 100mL LB 液体培养基中, 37℃, 250rpm 恒温培养 16-18h。

[322]. 3. 取过夜菌液接种至 2L LB 培养基中, 至起始浓度为 0.05 OD₆₀₀/mL, 37℃, 250 rpm 培养至对数生长期, 测 OD₆₀₀ 值。

[323]. 4. 将上述 3) 菌液转移至 2 L 离心桶中, 5,000 g 离心 20min, 收集菌体用生理盐水重悬, 调整菌体浓度为 50OD 左右, 取 100 μL 稀释 10⁷ 涂板计算活菌数。

[324]. 5. 取上述菌液置于辐照仪中, 辐照剂量为 1000Gy。

[325]. 6. 将辐照后的菌液 8,000×g, 20 min, 离心两次, 收集上清液; 上清液用 0.45μM 滤器过滤除菌再次收集得到的上清, 同时取少量上清液涂在 LB 平板上, 37℃培养 24-72h, 以确认无活菌存在。

[326]. 7. 将步骤 6) 上清液超高速离心机离心, 39,000×g, 90min, 沉淀 MVs。

[327]. 8. 弃去上清, 沉淀用 2 mL MV buffer 重悬, -80℃保存。

[328]. 9. 测定提取的正常组膜囊泡和本发明实验组膜囊泡的内容物含量, 包括测定其 DNA 含量、RNA 含量和蛋白质含量。

[329]. 实验结果:

[330]. 经测定结果表明, 对于金黄色葡萄球菌 ATCC27853, 实验组制备的膜囊泡的核酸含量和蛋白质含量明显提高, 表明, 电离射线辐照革兰氏阳性菌也能刺激膜囊泡的产生。见图 4。

[331]. **C 发明实施例五**

[332]. 辐照处理的细菌膜囊泡的免疫调节作用-促进树突状细胞成熟:

[333]. 1. 小鼠骨髓来源树突状细胞 (BMDC) 细胞诱导培养: 取 6-8 周 C57 雌性小鼠, 无菌分离小鼠股骨, 将股骨上的肌肉剔干净后剪开股骨两端, PBS 冲洗骨管腔直至发白, 将 PBS 悬液过滤后 1200rpm 离 5min, 去上清, 加入 5ml 红细胞裂解液重悬细胞。静置 15min 后 1200 rpm 离心 5min, 去上清, 加入 50ml 1640 完全培养基 (20ng/ml GM-CSF、10%FBS、50mM 2-巯基乙醇) 重悬细胞。混匀后分至 5 个培养皿中置培养箱中培养, 每 2 天换液, 第 7 天收集细胞。

[334]. 2. BMDC 刺激: 取诱导 7 天的 BMDC 细胞, 6 孔板中反复

吹打使贴壁细胞脱落，收集细胞悬液，1100 rpm 离心 5 min，去上清，加入 1 ml 培养基重悬细胞、活细胞计数，调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ，接种 2ml 至新的 6 孔板。加入各刺激物并混匀，分别为：全菌，全菌+囊泡，囊泡，使得终浓度为 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ （以蛋白质为标准），继续培养 24 小时，生长对照组加入等体积的 PBS。

[335]. 3.流式检测成熟 marker: 24h 后取出 6 孔板，反复吹打细胞使其脱落，收集细胞悬液至流式管，1500 rpm 离心 3 min，去上清，加入 1 ml PBS 继续 1500 rpm 离心 3 min 后去上清，反复清洗 3 遍。加入 CD11c/CD80/CD86/MHCII 抗体室温避光孵育 30min，同时阴性对照组应设立一个同型对照组加入 CD11c/CD80/CD86/MHCII 的同行对照。孵育完成后加入 PBS 清洗 2 遍后加入 200 μl PBS 重悬细胞，上流式细胞仪检测。

[336]. 4.结果处理：流式细胞仪软件分析 CD11c 细胞中 CD80/CD86/MHCII 比例。

[337]. 实验结果：

[338]. 与全菌体相比，X 射线处理的实验组（MV_s）囊泡能使刺激后 DC_s 表面共刺激分子 CD80、CD86 和 MHCII 等显著上调，而这些表面分子是树突状细胞成熟的标志。综上证明囊泡能显著促进 DC_s 的分化和成熟。见图 5。

[339]. **C 发明实施例六**

[340]. 通过检测 FITC 标记的葡聚糖荧光强度来检测 DC 细胞的吞噬能力：

[341]. 1.BMDC 细胞诱导培养。

[342]. 2.刺激：第 7 天收集细胞，将细胞全部吹下后离心重悬计数，然后接种到 6 孔板，每孔接种 1×10^6 个细胞，再分别加入刺激物，GC 组加入等体积的 PBS，Control 组及 Treatment 组加入相同浓度的膜囊泡（按蛋白质水平）后 37℃ 培养 24 h。

[343]. 3.吞噬与检测：加入葡聚糖（ $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ），继续培养 1 h 后，吸出细胞到流式管，PBS 洗涤 3 次后加入 CD11c 抗体室温避光孵育 30min，PBS 清洗 3 次后流式检测 FITC 荧光。

[344]. 4.结果处理：流式细胞仪软件分析 CD11c 细胞中 FITC 比例。

[345]. 实验数据：

[346]. 为了检测 DC_s 的吞噬功能，我们采用 FITC-葡聚糖作为模式抗原供 DC_s 吞噬，检测 CD11c+DC_s 的 FITC 平均荧光强度值。实验结果显示，GC 组树突状细胞（生长对照组）基本没有 FITC-葡聚糖摄入，但是无论是 DC_s 接受刺激后，FITC 平均荧光强度值相比于 GC 组明显降低。这个实验结果再次证明囊泡能够促进 DC_s 成熟，从

而降低对抗原的摄取能力。见图 6。

[347]. **C 发明实施例七**

[348]. X 射线处理组细菌膜囊泡刺激后的成熟 DC 与 T 细胞相互作用：

[349]. A、成熟 DC 与 CD4⁺T 细胞相互作用：

[350]. 1. BMDC 细胞诱导培养。

[351]. 2. 抗原吞噬：将培养 7 天的 DCs 在含 10 $\mu\text{g/ml}$ OVA 培养基中培养 24h 作为 GC (growth control, 生长对照组), MVs 组别另外加入囊泡, 接下来离心收集吞噬过抗原的 DCs 并重悬在正常培养基中, 以 2×10^4 细胞/孔的密度铺板于 96 孔板中, 每孔 100 μl , 每组 3 个复孔。

[352]. 3. T 细胞提取：在第二天, OT-II 小鼠脾脏 OVA 特异性的 CD4⁺T 淋巴细胞使用 Stem Cell Technologies 公司的阴性磁珠筛选试剂盒分离富集。

[353]. 4. DC 与 T 细胞共培养：对分选出的 CD4⁺T 细胞按照试剂盒说明书使用 1 μM CFSE 进行标记。标记后用 PBS 洗涤 3 次, 以 10^5 细胞/孔的密度加入到 96 孔板中, 使其培养终体积为 200 μl (CD4:DC=5:1)。

[354]. 5. 在共培养后的第 3 天, 利用流式细胞术通过 CFSE 递减来检测 CD4⁺T 细胞群的增殖情况。

[355]. 实验结果：

[356]. 将囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 OT-II 小鼠 CD4⁺T 淋巴细胞在体外共培养。流式分析 CFSE 荧光强度结果表明, 增殖 CD4⁺T 细胞的比例增加。囊泡 (14.05%) 能显著增加吞噬 OVA 抗原的 DCs (6.80%) 对于特异性 CD4⁺T 细胞的促进增殖作用。详见图 7、图 8。

[357]. B、囊泡处理后的 DC 促进 T 细胞增殖：

[358]. 1. BMDC 细胞诱导培养。

[359]. 2. 抗原吞噬：将培养 7 天的 DCs 在培养基中培养 24h 作为 GC (growth control, 生长对照组), MVs 组别另外加入囊泡, 接下来离心收集吞噬过抗原的 DCs 并重悬在正常培养基中, 以 4×10^4 细胞/孔的密度铺板于 96 孔板中, 每孔 100 μl , 每组 3 个复孔。

[360]. 3. T 细胞提取：在第二天, 使用 MVs 免疫一次后一周的小鼠脾脏 Stem Cell Technologies 公司的阴性磁珠筛选试剂盒分离富集小鼠的 T 细胞。

[361]. 4. DC 与 T 细胞共培养：对分选出的 T 细胞按照试剂盒说明书使用 1 μM CFSE 进行标记。标记后用 PBS 洗涤 3 次, 以 4×10^5 细胞/孔的密度加入到 96 孔板中, 使其培养终体积为 200 μl

(CD3:DC=10:1)。

[362]. 5.在共培养后的第3天,利用流式细胞术通过 CFSE 递减来检测 CD3+, CD8+, CD4+T 细胞群的增殖情况。

[363]. 实验结果:

[364]. 将囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 OT-II 小鼠 CD4+T 淋巴细胞在体外共培养。流式分析 CFSE 荧光强度结果表明,增殖 CD4+T 细胞的比例增加。如图所示,菌体加囊泡刺激组荧光强度为 63.5%,囊泡刺激组为 71%。说明,囊泡处理后 DCs,能显著刺激 CD4+T 细胞的增殖。见图 9。

D 发明:一种细菌膜囊泡的生产系统和分离纯化系统

[365]. D 发明涉及生物技术领域,具有涉及一种细菌膜囊泡的生产系统和分离纯化系统。

[366]. 针对现代工艺技术在制备及纯化细菌膜囊泡时存在的问题,D 发明提供一种易于工业化使用的细菌膜囊泡生产系统和纯化系统。

[367]. 一种细菌膜囊泡的生产系统,所述生产系统依次设有发酵单元 1 和辐照单元 2,所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成,所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成。

[368]. D 发明提供的发酵罐适合用于各种细菌的发酵,包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。

[369]. D 发明提供的紫外分光光度设备用于精确测量菌液的含菌量。

[370]. 进一步,所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐,或喷嘴环流式发酵罐。

[371]. 进一步,所述辐照设备 5 中的射线发射器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器,或 Co^{60} 同位素发生器。

[372]. D 发明的另一目的在于提供一种细菌膜囊泡的纯化系统。

[373]. 一种用于细菌膜囊泡的纯化系统,所述纯化系统依次设有发酵单元 1、辐照单元 2 和分离设备 6,所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成,所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成。

[374]. 进一步,所述分离设备 6 包括离心单元 7、膜包单元和/或过柱单元。

[375]. 进一步,所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐,或喷嘴环流式发酵罐。

[376]. 进一步,所述辐照设备 5 中的射线发射器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器,或 Co^{60} 同位素发生器。

[377]. 进一步,所述分离设备 6 包括离心单元 7,离心单元 7 为

普通离心机、高速离心机，或超高速离心机。

[378]. D 发明的另一目的在于提供一种细菌膜囊泡的分离系统。

[379]. 一种细菌膜囊泡的分离系统，所述分离系统依次设有发酵单元 1 和分离设备 6，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成。

[380]. 进一步，所述分离设备 6 包括离心单元 7、膜包单元和/或过柱单元。

[381]. 进一步，所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐，或喷嘴环流式发酵罐。

[382]. 进一步，所述分离设备 6 包括离心单元 7，离心单元 7 为普通离心机、高速离心机，或超高速离心机。

[383]. **D 发明实施例一**

[384]. 参见图 10。具体地，D 实施例的生产系统依次设有发酵单元 1 和辐照单元 2，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成，所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成。所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐，或喷嘴环流式发酵罐。所述辐照设备 5 中的射线发射器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器，或 Co^{60} 同位素发生器。

[385]. D 实施例中，革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌首先在发酵罐 3 中进行发酵，然后通过该紫光分光光度计 4 精确控制发酵菌液的含菌量在一定限度内，再利用辐照设备 5 对发酵后的菌液进行射线辐照处理，从而促进细菌大量产生 MVs，以提高 MVs 含量。

[386]. **D 发明实施例二**

[387]. 参见图 11。具体的，D 实施例的纯化系统依次设有发酵单元 1、辐照单元 2 和分离设备 6，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成，所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成，所述分离设备 6 由离心单元 7、膜包单元和/或过柱单元构成。

[388]. D 实施例中，革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌首先在该发酵罐 3 中进行发酵，然后通过紫外分光光度计 4 精确控制发酵菌液的含菌量在一定限度内，再利用辐照设备 5 对发酵后的菌液进行射线辐照处理，最后利用离心单元 7 对辐照处理后的菌液进行进一步的离心处理，依次除去发酵废液、细菌鞭毛、细菌分泌物等，最后沉淀获得的膜囊泡即为纯化后的膜囊泡。

[389]. D 实施例中，该射线辐照设备的射线发生器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器，或 Co^{60} 同位素发生器。

[390]. D 实施例中，发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐，或喷嘴环流式发酵罐。

[391]. D 实施例中，离心单元 7 包括离心机、高速离心机或超高

速离心机。

[392]. **D 发明实施例三**

[393]. 参见图 12。具体的，D 实施例的分离系统依次设有发酵单元 1 和离心单元 6，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成，所述分离设备 6 由离心单元 7 构成。

[394]. D 实施例中，革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌首先在该发酵罐 3 中进行发酵，然后再通过离心机 7 依次除去发酵废液、细菌鞭毛、细菌分泌物等废物。

[395]. D 实施例中，发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐，或喷嘴环流式发酵罐。

[396]. D 实施例中，离心单元 7 包括离心机、高速离心机或超高速离心机。

E 发明：一种细菌膜囊泡的生产系统和分离纯化系统及方法

[397]. E 发明涉及生物技术领域，具有涉及一种细菌膜囊泡的生产系统及方法，以及一种细菌膜囊泡的分离纯化系统及方法。

[398]. 基于现代工艺技术在生产制备及纯化细菌膜囊泡时存在的问题，E 本发明提供了一套提高细菌 MVs 产量的系统及方法，和一套纯化细菌 MVs 的系统及方法。本发明所采用工艺技术，不添加化学刺激物质，因此无不良作用，同时工艺流程简单、囊泡产量高，高效、放大效果好，可以用于囊泡的大量制备。

[399]. E 本发明的目的在于提供一种细菌膜囊泡的生产系统。

[400]. 一种细菌膜囊泡的生产系统，所述生产系统依次设有发酵单元 1 和辐照单元 2，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成，所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成。

[401]. 进一步，所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐，或喷嘴环流式发酵罐。

[402]. 进一步，所述辐照设备 5 中的射线发射器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器，或 Co^{60} 同位素发生器。

[403]. E 发明的目的还在于提供一种细菌膜囊泡的生产方法。

[404]. 采用上述的生产系统生产细菌膜囊泡的方法，包括如下步骤：

- 1) 培养细菌至对数生长期，发酵，使菌体进一步富集；
- 2) 收集菌体，将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬；
- 3) 用电离射线辐照处理。

[405]. 本发明所述细菌包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。所述细菌具体包括如下种类：

革兰氏阳性菌	金黄色葡萄球菌、链球菌、白喉杆菌、结核杆菌、破伤风杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌（以及上述菌的基因工程改造菌）等。
革兰氏阴性菌	铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、伤寒杆菌、脑膜炎双球菌、变形杆菌、志贺菌属（以及上述菌的基因工程改造菌）等。

[406]. 进一步，步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD_{600} 值为 0.3-0.8；步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD_{600} 值 20-80。

[407]. 优选的，步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD_{600} 值为 0.5-0.8；步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量 OD_{600} 值为 40-60。

[408]. 进一步，步骤 3) 中辐照处理用的射线为 X-ray 射线；辐照剂量范围为 500-3000Gy。所述辐照剂量具体包括：500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy, 1000-1100 Gy, 1100-1200 Gy, 1200-1300 Gy, 1300-1400 Gy, 1400-1500 Gy, 1500-1600 Gy, 1600-1700 Gy, 1700-1800 Gy, 1800-1900 Gy, 1900-2000 Gy, 2100-2200 Gy, 2200-2300 Gy, 2300-2400 Gy, 2400-2500 Gy, 2500-2600 Gy, 2600-2700 Gy, 2700-2800 Gy, 2800-2900 Gy, 2900-3000 Gy。

[409]. E 发明的目的还在于提供一种细菌膜囊泡的纯化系统。

[410]. 一种用于细菌膜囊泡的纯化系统，所述纯化系统依次设有发酵单元 1、辐照单元 2 和离心单元 6，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成，所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成，所述离心设备 6 由离心单元 7 构成。

[411]. 进一步，所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐，或喷嘴环流式发酵罐。

[412]. 进一步，所述辐照设备 5 中的射线发射器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器，或 Co^{60} 同位素发生器。

[413]. 进一步，所述离心单元 7 为普通离心机、高速离心机，或超高速离心机。

[414]. E 发明的目的还在于提供一种细菌膜囊泡的纯化方法。

[415]. 采用上述的纯化系统纯化细菌膜囊泡的方法，其特征在于，包括如下步骤：

- 1) 培养细菌至对数生长期，发酵，使菌体进一步富集；
- 2) 收集菌体，将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬并

用电离射线辐照处理；

3) 收集辐照处理后的菌液，离心并弃上清液，上清液用 0.3-0.5 μ M 滤器过滤除菌；

4) 将过滤后的上清液用高速离心机离心，收集上清液，去除鞭毛；

5) 将去除鞭毛后的上清液超高速离心，沉淀膜囊泡；

6) 收集纯化后的膜囊泡。

[416]. 进一步，步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD_{600} 值为 0.3-0.8；步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD_{600} 值 20-80。

[417]. 优选的，步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD_{600} 值为 0.5-0.8；步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量 OD_{600} 值为 40-60。

[418]. 进一步，步骤 3) 中辐照处理用的射线为 X-ray 射线；辐照剂量范围为 500-3000Gy。所述辐照剂量具体包括：500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy, 1000-1100 Gy, 1100-1200 Gy, 1200-1300 Gy, 1300-1400 Gy, 1400-1500 Gy, 1500-1600 Gy, 1600-1700 Gy, 1700-1800 Gy, 1800-1900 Gy, 1900-2000 Gy, 2100-2200 Gy, 2200-2300 Gy, 2300-2400 Gy, 2400-2500 Gy, 2500-2600 Gy, 2600-2700 Gy, 2700-2800 Gy, 2800-2900 Gy, 2900-3000 Gy。

[419]. 进一步，步骤 3) 中辐照后菌液离心的速率为 100-10000g；离心时间为 10-60min。

[420]. 优选的，步骤 3) 的离心的速率为 400-8000g；离心时间为 10-30min。

[421]. 进一步，步骤 4) 中高速离心的速率为 5000-25000g；离心时间为 10-100min。

[422]. 优选的，步骤 4) 的高速离心速率为 10000-20000g；离心时间为 30-60min。

[423]. 进一步，步骤 5) 中超高速离心的速率为 5000-150000g；离心时间为 60-600min。

[424]. 优选的，步骤 5) 的超高速离心速率为 15000-150000g；离心时间为 60-180min。

[425]. **E 发明实施例一**

[426]. 参见图 10。具体地，E 实施例的生产系统依次设有发酵单元 1 和辐照单元 2，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成，所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成。所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐，或喷嘴环流式发酵罐。所述辐照设备 5 中的射线发射器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器，或 Co^{60} 同位素发生器。

[427]. E 实施例中,革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌首先在发酵罐 3 中进行发酵,然后通过该紫光分光光度计 4 精确控制发酵菌液的含菌量在一定限度内,再利用辐照设备 5 对发酵后的菌液进行射线辐照处理,从而促进细菌大量产生 MVs。

[428]. 采用上述生产系统生产细菌膜囊泡的方法,包括如下步骤:

1) 培养细菌至对数生长期,对数生长期的细菌的 OD_{600} 值为 0.3-0.8; 然后发酵,使菌体进一步富集;

2) 收集菌体,将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬,所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量 OD_{600} 值为 20-80;

3) 用 X-ray 射线辐照菌液,辐照剂量范围为 500-3000Gy,可具体选择的限度包括 500-600 Gy, 600-700 Gy, 700-800 Gy, 800-900 Gy, 900-1000 Gy, 1000-1100 Gy, 1100-1200 Gy, 1200-1300 Gy, 1300-1400 Gy, 1400-1500 Gy, 1500-1600 Gy, 1600-1700 Gy, 1700-1800 Gy, 1800-1900 Gy, 1900-2000 Gy, 2100-2200 Gy, 2200-2300 Gy, 2300-2400 Gy, 2400-2500 Gy, 2500-2600 Gy, 2600-2700 Gy, 2700-2800 Gy, 2800-2900 Gy, 2900-3000 Gy。

[429]. **E 发明实施例二**

[430]. 参见图 11。具体的, E 实施例的纯化系统依次设有发酵单元 1、辐照单元 2 和离心单元 6, 所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成, 所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成, 所述离心单元 6 由离心机 7 构成。

[431]. E 实施例中,革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌首先在该发酵罐 3 中进行发酵,然后通过紫外分光光度计 4 精确控制发酵菌液的含菌量在一定限度内,再利用辐照设备 5 对发酵后的菌液进行射线辐照处理,最后利用离心设备 6 对辐照处理后的菌液进行进一步的离心处理,依次除去发酵废液、细菌鞭毛、细菌分泌物等,最后沉淀获得的膜囊泡即为纯化后的膜囊泡。

[432]. E 实施例中,该射线辐照设备的射线发生器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器,或 Co^{60} 同位素发生器。

[433]. E 实施例中,发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐,或喷嘴环流式发酵罐。

[434]. E 实施例中,离心单元 7 包括离心机、高速离心机或超高速离心机。

[435]. 采用上述纯化系统纯化细菌膜囊泡的方法,包括如下步骤:

1) 培养细菌至对数生长期,对数生长期的细菌的 OD_{600} 值为 0.3-0.8; 发酵,使菌体进一步富集;

2) 收集菌体,将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬,

所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD₆₀₀ 值 20-80; 重悬后的菌液用 X-ray 射线辐照处理, 辐照剂量范围为 500-3000Gy;

3) 收集辐照处理后的菌液离心, 离心的速率为 100-10000g, 离心时间为 10-60min; 离心完毕后弃上清液, 上清液用 0.45μm 滤器过滤除菌;

4) 将除菌后的上清液用高速离心机离心, 高速离心的速率为 5000-25000g, 离心时间为 10-100min; 收集上清液, 去除鞭毛;

5) 将去除鞭毛后的上清超高速离心, 超高速离心的速率为 5000-150000g, 离心时间为 60-600min; 沉淀膜囊泡;

6) 收集优化生产后的膜囊泡。

[436]. 上面结合附图对本发明的实施例进行了描述, 但是本发明并不局限于上述的具体实施方式, 上述的具体实施方式仅仅是示意性的, 而不是限制性的, 本领域的普通技术人员在本发明的启示下, 在不脱离本发明宗旨和权利要求所保护的范围情况下, 还可做出很多形式, 这些均属于本发明的保护之内。

[437]. **参考文献**

[438]. Beveridge T J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles [J]. Journal of bacteriology, 1999, 181(16): 4725-4733.

[439]. Kulp A, Kuehn M J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles [J]. Annual review of microbiology, 2010, 64 (163-184).

[440]. Devos S, Van Oudenhove L, Stremersch S, Van Putte W, De Rycke R, et. al. The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. Frontiers in Microbiology, 2015 vol: 6 pp: 298.

1. 细菌产生的生物颗粒，其特征在于，所述生物颗粒是从灭活细菌中分离的膜囊泡。
2. 根据权利要求 1 所述的生物颗粒，其特征在于，所述灭活细菌包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和/或基因工程改造菌。
3. 根据权利要求 2 所述的生物颗粒，其特征在于，所述革兰氏阳性菌包括金黄色葡萄球菌、链球菌、白喉杆菌、结核杆菌、破伤风杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌，以及上述菌的基因工程改造菌中的一种或多种。
4. 根据权利要求 2 所述的生物颗粒，其特征在于，所述革兰氏阴性菌包括铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、伤寒杆菌、脑膜炎双球菌、变形杆菌、志贺菌，以及上述菌的基因工程改造菌中的一种或多种。
5. 根据权利要求 1 所述的生物颗粒，其特征在于，所述灭活细菌为厌氧菌。
6. 一种生物组合物，其特征在于，含有权利要求 1 中所述膜囊泡和所述灭活细菌。
7. 根据权利要求 6 所述的生物组合物，其特征在于，所述膜囊泡作为疫苗和/或疫苗佐剂和/或药物载体与所述灭活细菌组合。
8. 从细菌中分离膜囊泡的方法，所述细菌包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌，其特征在于，具体包括以下步骤：
 - 1) 将培养细菌的菌液中的菌体和培养液进行分离，收集获得上清液 1；
 - 2) 将所述上清液 1 用高速离心机离心，收集上清液 2；
 - 3) 将所述上清液 2 用超高速离心机离心，沉淀为膜囊泡。
9. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述步骤 1) 中的分离方法包括离心、过柱或膜包浓缩。
10. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，在所述步骤 2) 中收集获得的所述上清液 2 在进入所述步骤 3) 之前，先经膜包浓缩。
11. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，将所述膜囊泡用缓冲液重悬，所述缓冲液按 1 L 体积计算，包括 50mM Tris, 5mM NaCl, 1mM MgSO₄，并且 pH 值为 7.4。
12. 一种制备生物组合物的方法，其特征在于，收集经权利要求 8 所述步骤 1) 分离出的所述菌体，将所述菌体与经权利要求 8 所述步骤 3) 所得的所述膜囊泡混合形成所述生物组合物。
13. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述步骤 1) 中，将所述上清液 1 用 0.3-0.5 μ m 滤器过滤去杂。
14. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述步骤 1) 中的分离方法为离心，所述离心的离心速率为 100-10000g；离心时间

为 10-60min。

15. 根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 2) 中的所述高速离心速率为 5000-25000g; 离心时间为 10-100min。
16. 根据权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 2) 中高速离心速率为 10000-20000g; 离心时间为 30-60min。
17. 根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 3) 中的所述超高速离心速率为 5000-150000g; 离心时间为 60-600min。
18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 3) 中所述的超高速离心速率为 15000-150000g; 离心时间为 60-180min。
19. 根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述革兰氏阳性菌包括金黄色葡萄球菌、链球菌、白喉杆菌、结核杆菌、破伤风杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌, 以及上述菌的基因工程改造菌。
20. 根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述革兰氏阴性菌包括铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、伤寒杆菌、脑膜炎双球菌、变形杆菌、志贺菌, 以及上述菌的基因工程改造菌。
21. 根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述细菌为灭活细菌。
22. 权利要求 8-21 任一方法所得的膜囊泡。
23. 制备权利要求 1 所述的生物颗粒的方法, 其特征在于, 具体包括以下步骤:
 - 1) 培养细菌至对数生长期;
 - 2) 收集菌体, 将所述菌体重悬后用电离射线辐照处理, 得辐照细菌;
 - 3) 用权利要求 8-21 所述的方法进行分离, 获得膜囊泡。
24. 根据权利要求 23 所述的方法, 其特征在于, 所述电离射线辐照处理的方式为 X-ray 射线, 辐照剂量为 500-3000Gy。
25. 根据权利要求 24 所述的方法, 其特征在于, 所述辐照剂量为 500-1000Gy。
26. 根据权利要求 23 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.3-0.8。
27. 根据权利要求 26 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.5-0.7。
28. 根据权利要求 23 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 1) 中用磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬所述菌体。
29. 根据权利要求 23 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 1) 中将所述菌体重悬至 OD₆₀₀ 值为 20-80。
30. 根据权利要求 29 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 1) 中将所述菌体重悬至 OD₆₀₀ 值为 40-60。

31. 权利要求 23-30 任一所述的方法所得的膜囊泡。
32. 根据权利要求 31 所述的膜囊泡，其特征在于，同未经电离射线辐照的细菌相比，所述膜囊泡中核酸的含量和蛋白质的含量提升了 10-20 倍。
33. 权利要求 22、31 或 32 所述的膜囊泡作为免疫反应促进剂中的应用。
34. 权利要求 22、31 或 32 所述的膜囊泡作为治疗细菌感染疾病的疫苗中的应用。
35. 根据权利要求 34 所述的应用，其特征在于，所述细菌感染疾病包括肺炎、泌尿道感染、脑膜炎、败血症，或皮肤、软组织感染。
36. 权利要求 22、31 或 32 所述的膜囊泡作为疫苗佐剂中的应用。
37. 根据权利要求 34 所述的应用，其特征在于，所述疫苗佐剂为非特异性地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答。
38. 权利要求 22、31 或 32 所述的膜囊泡作为抗原递呈细胞功能促进剂中的应用。
39. 根据权利要求 38 所述的应用，其特征在于，抗原递呈细胞包括树突状细胞、巨噬细胞及 B 细胞。
40. 权利要求 31 所述的膜囊泡作为 DC 细胞成熟的促进剂中的应用。
41. 根据权利要求 40 所述的应用，其特征在于，所述的膜囊泡作为促进骨髓来源树突状细胞细表面分子 CD80、CD86 及 MHCII 分子显著上调的促进剂中的应用。
42. 权利要求 22、31 或 32 所述的膜囊泡作为 DC 细胞抗原递呈能力促进剂中的应用。
43. 权利要求 22、31 或 32 所述的膜囊泡联合 DC 细胞在制备 CD4+T 细胞的增殖剂中的应用。
44. 促进 CD4+T 细胞增殖的方法，其特征在于，将权利要求 31 所述的膜囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 CD4+T 淋巴细胞在体外共培养。
45. 权利要求 22、31 或 32 所述的膜囊泡在制备兽药中的应用。
46. 权利要求 6 或 7 所述的生物组合物作为细菌疫苗的应用。
47. 铜绿假单胞菌疫苗，其特征在于，所述铜绿假单胞菌疫苗含有从灭活铜绿假单胞菌中分离的膜囊泡。
48. 一种生物组合物，其特征在于，含有如权利要求 47 中的所述膜囊泡与所述灭活铜绿假单胞菌。
49. 根据权利要求 48 所述的生物组合物，其特征在于，所述膜囊

泡作为疫苗和/或疫苗佐剂和/或药物载体与所述灭活铜绿假单胞菌组合。

50. 从铜绿假单胞菌中分离膜囊泡的方法，其特征在于，包括如下步骤：
- 1) 培养细菌至对数生长期；
 - 2) 收集菌液，菌液离心并取上清液 1，所述上清液 1 用 0.3-0.5 μ M 滤器过滤除菌；
 - 3) 将过滤后的所述上清液 1 用高速离心机离心，收集上清液 2，去除鞭毛；
 - 4) 将去除鞭毛后的所述上清液 2 用超高速离心机离心，沉淀即得到膜囊泡。
51. 根据权利要求 50 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 的上清液用 0.45 μ M 滤器过滤除菌。
52. 根据权利要求 50 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 的离心速率为 100-10000g；离心时间为 10-60min。
53. 根据权利要求 50 所述的方法，其特征在于，步骤 3) 的高速离心速率为 5000-25000g；离心时间为 10-100min。
54. 根据权利要求 50 所述的方法，其特征在于，步骤 4) 的超高速离心速率为 5000-150000g；离心时间为 60-600min。
55. 根据权利要求 50 所述的方法，其特征在于，所述铜绿假单胞菌为灭活的铜绿假单胞菌。
56. 权利要求 50-55 所述任一方法得到的铜绿假单胞菌膜囊泡。
57. 制备权利要求 47 所述的铜绿假单胞菌疫苗的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：
- 1) 培养细菌至对数生长期；
 - 2) 收集菌体，将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬并用电离射线辐照处理；
 - 3) 收集辐照处理后的菌液，离心并取上清液 1，所述上清液 1 用 0.3-0.5 μ M 滤器过滤除菌；
 - 4) 将过滤后的所述上清液 1 用高速离心机离心，收集上清液 2，去除鞭毛；
 - 5) 将去除鞭毛后的所述上清液进行超高速离心，沉淀即得膜囊泡。
58. 根据权利要求 57 所述的方法，其特征在于，步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.3-0.8。
59. 根据权利要求 57 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD₆₀₀ 值 20-80。
60. 根据权利要求 57 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 中辐照

处理用的射线为 X-ray 射线；辐照剂量为 500-3000Gy。

61. 根据权利要求 57 所述的方法，其特征在于，步骤 3) 中的离心速率为 100-10000g；离心时间为 10-60min。
62. 根据权利要求 57 所述的方法，其特征在于，步骤 3) 中上清液用 0.45 μ M 滤器过滤除菌。
63. 根据权利要求 57 所述的方法，其特征在于，步骤 4) 中所述的高速离心速率为 5000-25000g；离心时间为 10-100min。
64. 根据权利要求 57 所述的方法，其特征在于，步骤 5) 中所述的超高速离心速率为 5000-150000g；离心时间为 60-600min。
65. 权利要求 57-64 所述任一方法制得的铜绿假单胞菌膜囊泡和疫苗。
66. 根据权利要求 65 所述的铜绿假单胞菌膜囊泡，其特征在于，同未经电离射线辐照的细菌膜囊泡相比，所述膜囊泡中核酸的含量和蛋白质的含量提升了 10-20 倍。
67. 一种提高铜绿假单胞菌膜囊泡内容物含量的方法，所述内容物包括核酸和蛋白质，其特征在于，所述方法采用辐照设备处理铜绿假单胞菌菌液，所述辐照设备的射线为 X-ray 射线，辐照剂量为 500-1000Gy。
68. 权利要求 56、65 或 66 所述的铜绿假单胞菌膜囊泡在制备抗细菌感染疫苗中的应用，其特征在于，所述铜绿假单胞菌膜囊泡可作为疫苗的佐剂使用。
69. 根据权利要求 68 所述的应用，其特征在于，所述疫苗佐剂可以非特异性地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答。
70. 根据权利要求 68 所述的应用，其特征在于，所述细菌感染疾病包括肺炎、泌尿道感染、脑膜炎、败血症，或皮肤、软组织感染。
71. 根据权利要求 68 所述的应用，其特征在于，所述铜绿假单胞菌膜囊泡还可作为疫苗的载体应用。
72. 权利要求 56、65 或 66 所述的铜绿假单胞菌膜囊泡作为免疫反应促进剂中的应用。
73. 权利要求 56、65 或 66 所述的铜绿假单胞菌膜囊泡作为抗原递呈细胞功能促进剂中的应用。
74. 根据权利要求 73 所述的应用，其特征在于，抗原递呈细胞包括树突状细胞、噬细胞及 B 细胞。
75. 权利要求 65 所述的铜绿假单胞菌膜囊泡在制备 DC 细胞生长促进剂中的应用，其特征在于，所述铜绿假单胞菌膜囊泡能刺激 DC 细胞表面共刺激分子 CD80、CD86 和 MHCII 显著上调，促进

DC 细胞成熟和分化。

76. 权利要求 56、65 或 66 所述的铜绿假单胞菌膜囊泡作为 DC 细胞抗原递呈能力促进剂中的应用。
77. 一种促进 CD4+T 细胞增值的方法，其特征在于，将权利要求 65 所述的铜绿假单胞菌膜囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 CD4+T 淋巴细胞在体外共培养。
78. 权利要求 56、65 或 66 所述的铜绿假单胞菌膜囊泡在制备兽药中的应用。
79. 权利要求 48 或 49 所述的生物组合物作为细菌疫苗的应用。
80. 金黄色葡萄球菌产生的生物颗粒，其特征在于，所述生物颗粒是从灭活金黄色葡萄球菌中分离的膜囊泡。
81. 一种生物组合物，其特征在于，含有如权利要求 80 所述的膜囊泡和所述灭活金黄色葡萄球菌。
82. 根据权利要求 81 所述的生物组合物，其特征在于，所述膜囊泡作为疫苗和/或疫苗佐剂和/或药物载体与所述灭活金黄色葡萄球菌组合。
83. 从金黄色葡萄球菌中分离膜囊泡的方法，其特征在于，包括如下步骤：
 - 1) 培养细菌至对数生长期；
 - 2) 收集菌液，菌液离心并取上清液 1，所述上清液 1 用 0.3-0.5 μ M 滤器过滤除菌；
 - 3) 将过滤后的所述上清液 1 用高速离心机离心，收集上清液 2；
 - 4) 将所述上清液 2 用超高速离心机离心，沉淀即得到膜囊泡。
84. 根据权利要求 83 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 的上清液用 0.45 μ M 滤器过滤除菌。
85. 根据权利要求 83 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 的离心速率为 100-10000g；离心时间为 10-60min。
86. 根据权利要求 83 所述的方法，其特征在于，步骤 3) 的高速离心速率为 5000-25000g；离心时间为 10-100min。
87. 根据权利要求 83 所述的方法，其特征在于，步骤 4) 的超高速离心速率为 5000-150000g；离心时间为 60-600min。
88. 根据权利要求 83 所述的方法，其特征在于，所述金黄色葡萄球菌为灭活的金黄色葡萄球菌。
89. 权利要求 83-88 所述任一方法得到的金黄色葡萄球菌膜囊泡。
90. 制备权利要求 80 所述的生物颗粒的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：
 - 1) 培养细菌至对数生长期；
 - 2) 收集菌体，将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬

- 并用电离射线辐照处理；
- 3) 收集辐照处理后的菌液，离心并取上清液 1，所述上清液 1 用 0.3-0.5 μ M 滤器过滤除菌；
- 4) 将过滤后的所述上清液 1 用高速离心机离心，收集上清液 2；
- 5) 将所述上清液 2 超高速离心，沉淀即得到膜囊泡。
91. 根据权利要求 90 所述的方法，其特征在于，步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD₆₀₀ 值为 0.3-0.8。
92. 根据权利要求 90 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD₆₀₀ 值 20-80。
93. 根据权利要求 90 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 中辐照处理用的射线为 X-ray 射线；辐照剂量为 500-3000Gy。
94. 根据权利要求 90 所述的方法，其特征在于，步骤 3) 中的离心速率为 100-10000g；离心时间为 10-60min。
95. 根据权利要求 90 所述的方法，其特征在于，步骤 3) 中上清液用 0.45 μ M 滤器过滤除菌。
96. 根据权利要求 90 所述的方法，其特征在于，步骤 4) 中所述的高速离心速率为 5000-25000g；离心时间为 10-100min。
97. 根据权利要求 90 所述的方法，其特征在于，步骤 5) 中所述的超高速离心速率为 5000-150000g；离心时间为 60-600min。
98. 权利要求 90-97 所述任一方法制得的金黄色葡萄球菌膜囊泡。
99. 一种提高金黄色葡萄球菌膜囊泡内容物含量的方法，所述内容物包括核酸和蛋白质，其特征在于，所述方法采用辐照设备处理金黄色葡萄球菌菌液，所述辐照设备的射线为 X-ray 射线，辐照剂量为 500-1000Gy。
100. 权利要求 89 或 98 所述的金黄色葡萄球菌膜囊泡在制备抗细菌感染疫苗中的应用，其特征在于，所述金黄色葡萄球菌膜囊泡可作为疫苗的佐剂使用。
101. 根据权利要求 100 所述的应用，其特征在于，所述疫苗佐剂可以非特异性地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答。
102. 根据权利要求 100 所述的应用，其特征在于，所述细菌感染疾病包括肺炎、泌尿道感染、脑膜炎、败血症，或皮肤、软组织感染。
103. 根据权利要求 100 所述的应用，其特征在于，所述金黄色葡萄球菌膜囊泡还可作为疫苗的载体应用。
104. 权利要求 89 或 98 所述的金黄色葡萄球菌膜囊泡作为免疫原的应用。

105. 权利要求 89 或 98 所述的金黄色葡萄球菌膜囊泡作为抗原递呈细胞功能促进剂中的应用。
106. 根据权利要求 105 所述的应用，其特征在于，抗原递呈细胞包括树突状细胞、噬细胞及 B 细胞。
107. 权利要求 98 所述的金黄色葡萄球菌膜囊泡在制备 DC 细胞生长促进剂中的应用，其特征在于，所述金黄色葡萄球菌膜囊泡能刺激 DC 细胞表面共刺激分子 CD80、CD86 和 MHCII 显著上调，促进 DC 细胞成熟和分化。
108. 权利要求 89 或 98 所述的金黄色葡萄球菌膜囊泡作为 DC 细胞抗原递呈能力促进剂中的应用。
109. 一种促进 CD4⁺T 细胞增值的方法，其特征在于，将权利要求 98 所述的金黄色葡萄球菌膜囊泡刺激并吞噬 OVA 抗原的 DCs 与 CFSE 标记的 CD4⁺T 淋巴细胞在体外共培养。
110. 权利要求 89 或 98 所述的金黄色葡萄球菌膜囊泡在制备兽药中的应用。
111. 权利要求 81 或 82 所述的灭活金黄色葡萄球菌作为细菌疫苗的应用。
112. 一种细菌膜囊泡的生产系统，其特征在于，所述生产系统依次设有发酵单元 1 和辐照单元 2，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成，所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成。
113. 根据权利要求 112 所述的生产系统，其特征在于，所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐或喷嘴环流式发酵罐。
114. 根据权利要求 112 所述的生产系统，其特征在于，所述辐照设备 5 中的射线发射器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器或 Co⁶⁰ 同位素发生器。
115. 一种用于细菌膜囊泡的纯化系统，其特征在于，所述纯化系统依次设有发酵单元 1、辐照单元 2 和分离设备 6，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成，所述辐照单元 2 由辐照设备 5 构成。
116. 如权利要求 115 所述的纯化系统，其特征在于，所述分离设备 6 包括离心单元 7、膜包单元和/或过柱单元。
117. 根据权利要求 115 所述的纯化系统，其特征在于，所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐或喷嘴环流式发酵罐。
118. 根据权利要求 115 所述的纯化系统，其特征在于，所述辐照设备 5 中的射线发射器为 X 射线发生器、 γ 射线发生器或 Co⁶⁰ 同位素发生器。
119. 根据权利要求 116 所述的纯化系统，其特征在于，所述分离设备 6 包括离心单元 7，所述离心单元 7 为普通离心机、高速离心机

或超高速离心机。

120. 一种用于细菌膜囊泡的分离系统，其特征在于，所述分离系统依次设有发酵单元 1 和分离设备 6，所述发酵单元 1 由细菌发酵罐 3 和紫外分光光度计 4 构成。
121. 根据权利要求 120 所述的分离系统，其特征在于，所述分离设备 6 包括离心单元 7、膜包单元和/或过柱单元。
122. 根据权利要求 121 所述的分离系统，其特征在于，所述发酵罐 3 为通风发酵罐、鼓泡发酵罐、气升式发酵罐或喷嘴环流式发酵罐。
123. 根据权利要求 121 所述的分离系统，其特征在于，所述分离设备包括离心单元 7，所述离心单元 7 为普通离心机、高速离心机或超高速离心机。
124. 采用权利要求 112-114 任一项所述的生产系统生产细菌膜囊泡的方法，其特征在于，包括如下步骤：
 - 1) 培养细菌至对数生长期；
 - 2) 收集菌体，将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬；
 - 3) 用电离射线辐照处理。
125. 根据权利要求 124 所述的方法，其特征在于，步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD_{600} 值为 0.3-0.8；步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD_{600} 值 20-80。
126. 根据权利要求 124 所述的方法，步骤 3) 中辐照处理用的射线为 X-ray 射线；辐照剂量范围为 500-3000Gy。
127. 采用权利要求 115-119 任一项所述的纯化系统纯化细菌膜囊泡的方法，其特征在于，包括如下步骤：
 - 1) 培养细菌至对数生长期；
 - 2) 收集菌体，将菌体用适量的磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水重悬并用电离射线辐照处理；
 - 3) 收集辐照处理后的菌液，离心并取上清液 1，所述上清液 1 用 0.3-0.5 μ M 滤器过滤除菌；
 - 4) 将过滤后的所述上清液 1 用高速离心机离心，收集上清液 2，去除鞭毛；
 - 5) 将去除鞭毛后的所述上清液 2 超高速离心，沉淀即得到膜囊泡；
 - 6) 收集纯化后的膜囊泡，用缓冲液重悬。
128. 根据权利要求 127 所述的方法，其特征在于，步骤 1) 中所述对数生长期的细菌的 OD_{600} 值为 0.3-0.8；步骤 2) 中所加磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的量与菌体总量的比例为每 1ml 溶液含有的菌量为 OD_{600} 值 20-80。
129. 根据权利要求 127 所述的方法，其特征在于，步骤 3) 中辐照

处理用的射线为 X-ray 射线；辐照剂量范围为 500-3000Gy。

130. 根据权利要求 127 所述的方法，其特征在于，步骤 3) 中辐照后菌液离心的速率为 100-10000g；离心时间为 10-60min。
131. 根据权利要求 127 所述的方法，其特征在于，步骤 4) 中高速离心的速率为 5000-25000g；离心时间为 10-100min。
132. 根据权利要求 127 所述的方法，其特征在于，步骤 5) 中超高速离心的速率为 5000-150000g；离心时间为 60-600min。

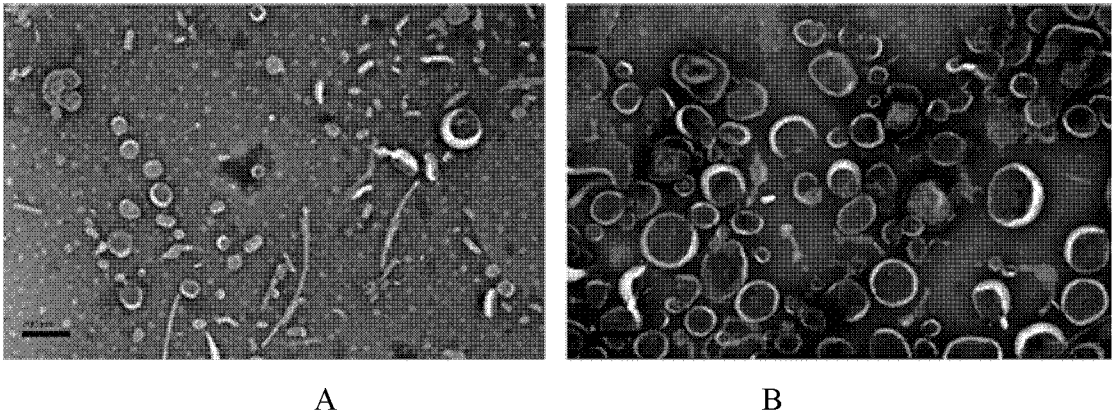


图 1

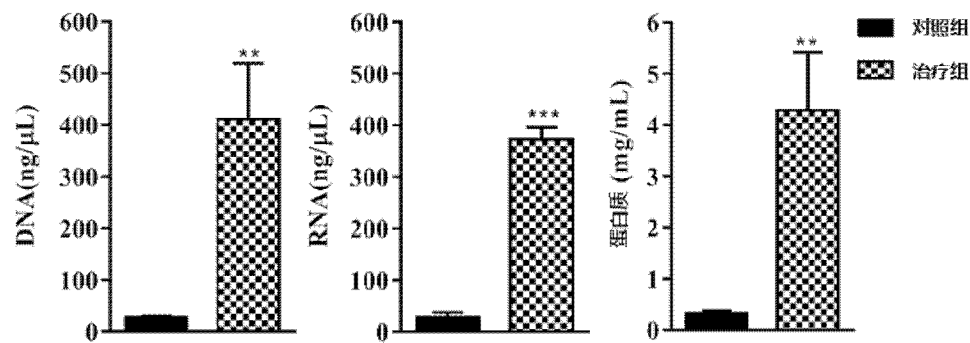


图 2

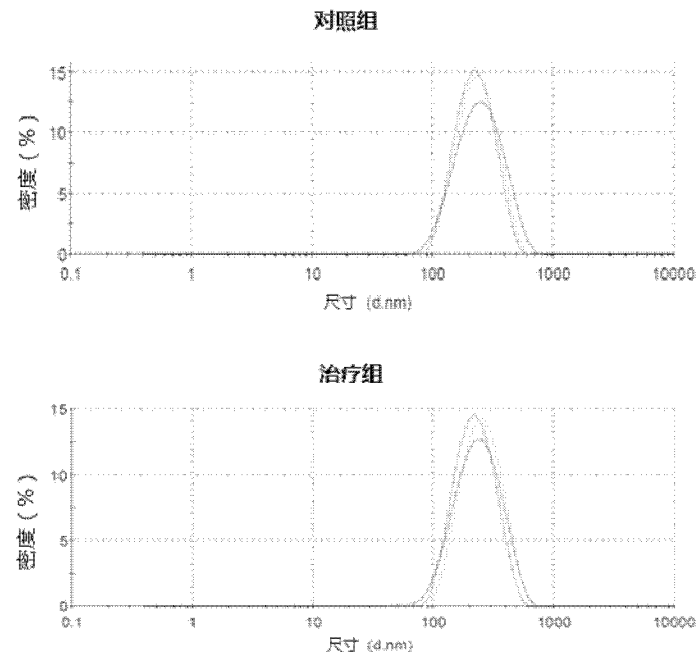


图 3

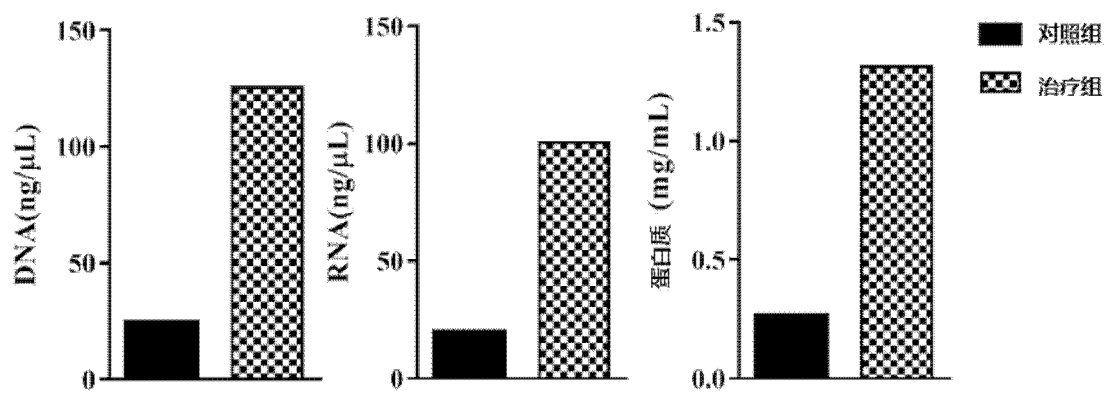


图 4

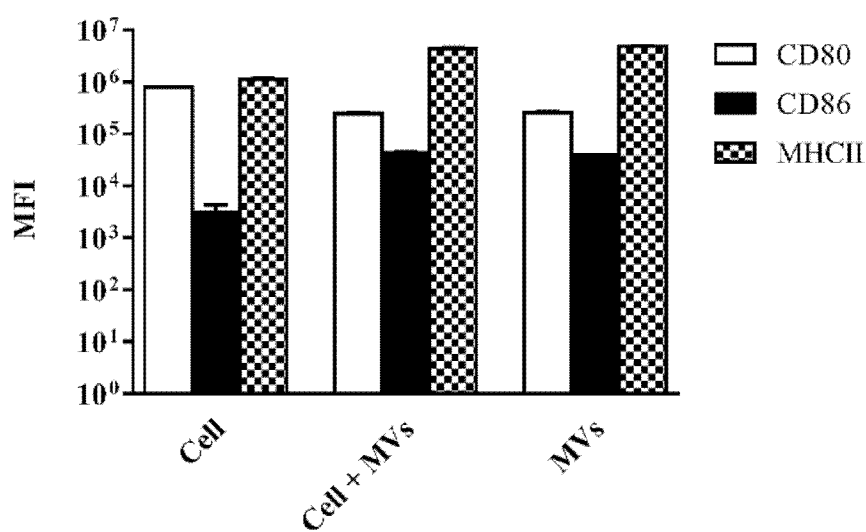


图 5

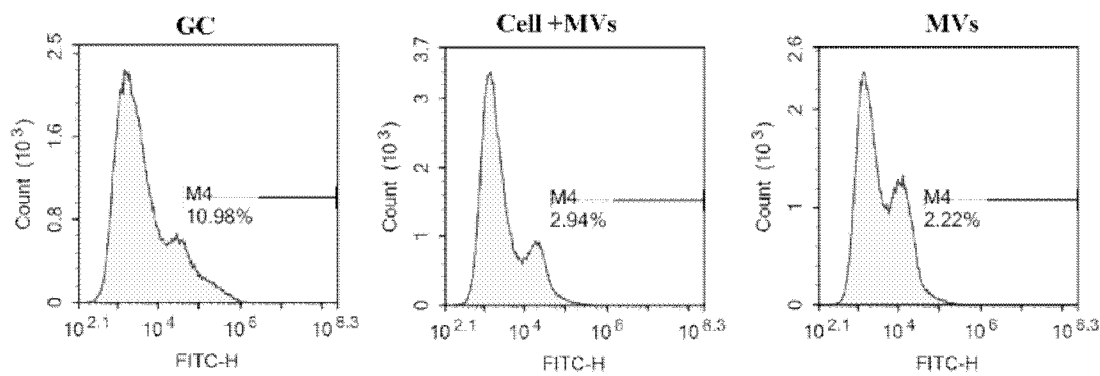


图 6

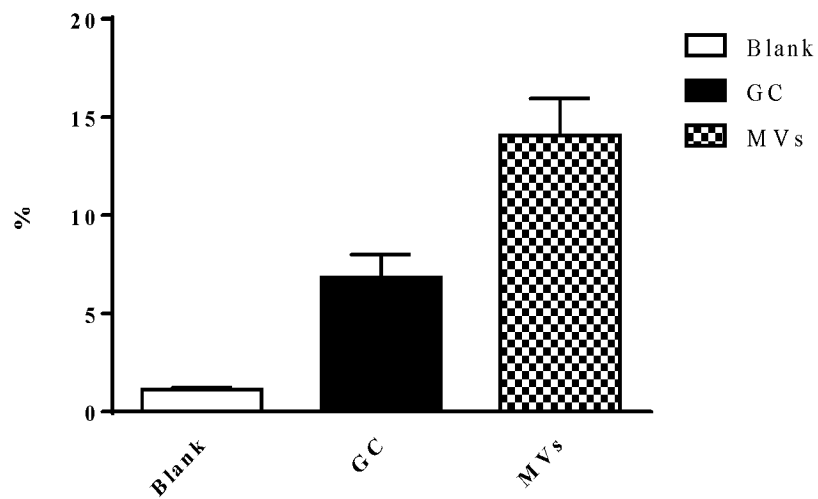


图 7

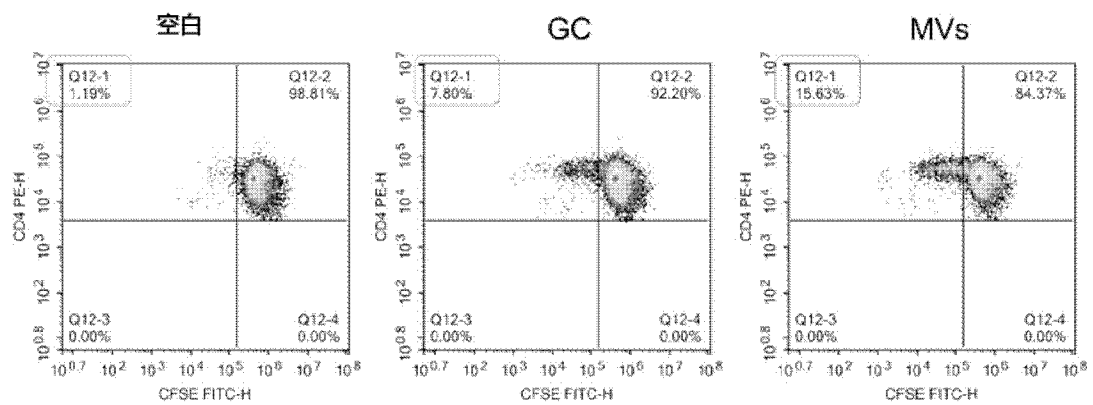
CD4⁺ T 细胞与DCs细胞共作用后的增殖结果

图 8

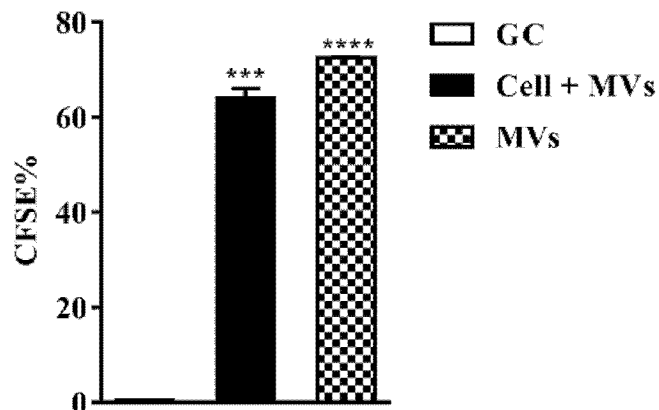


图 9

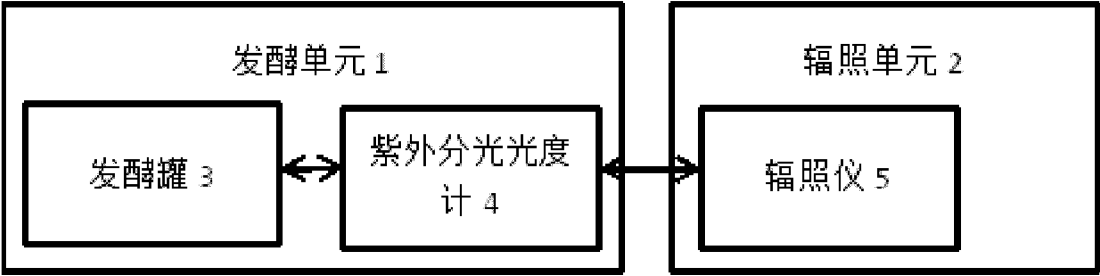


图 10

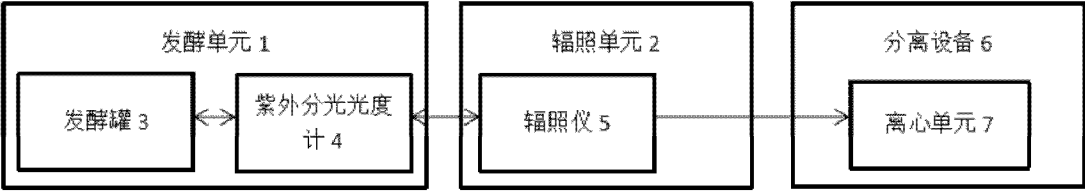


图 11

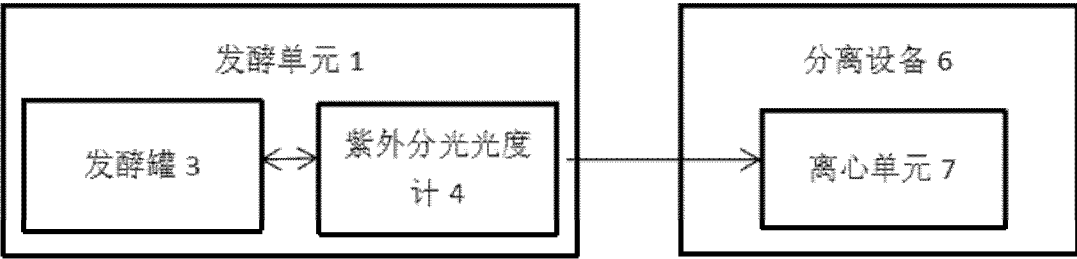


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/106654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/095(2006.01)i; A61K 39/104(2006.01)i; A61K 39/112(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, STN: 膜囊泡, 外膜囊泡, MVs, membrane vesicles, 细菌, bacteria, 革兰氏阳性, gram-positive, 革兰氏阴性, gram-negative, 金黄色葡萄球菌, staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa, 铜绿假单胞菌, 电离射线, 电离辐射, 辐照, 电离辐照, ionizing radiation, ionization radiation, γ 射线, X射线, γ - rays, X- rays, Co60, 高速离心, high-speed centrifugation, 超高速离心, extra-high speed centrifugation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1688334 A (CHIRON SRL) 26 October 2005 (2005-10-26) description page 2 paragraph 2 to page 5	1-5, 8-11, 22, 34-35, 37, 45, 47, 50-56, 78, 80, 83-89, 104, 110-111, 120-123
Y	CN 1688334 A (CHIRON SRL) 26 October 2005 (2005-10-26) description page 2 paragraph 2 to page 5	6-7, 12-21, 23-46, 48- 49, 57-79, 81-82, 90- 110, 112-119, 124-132
X	WO 2015144691 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA) 01 October 2015 (2015-10-01) description abstract, page 15 line 27 to page 16, page 21 lines 20-23, page 24 lines 18 to 26	47
Y	WO 2015144691 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA) 01 October 2015 (2015-10-01) description abstract, page 15 line 27 to page 16, page 21 lines 20-23, page 24 lines 18 to 26	48, 49



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2020

Date of mailing of the international search report

21 May 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/106654

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CAI, W. et al. "Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based" <i>Diagnostic Pathology</i> , Vol. 13, 31 December 2018 (2018-12-31), Article 95, pages 1-12	6-7, 12-21, 33, 36, 38-44, 46, 48-49, 68-77, 79, 81-82, 100-103, 105-109
Y	GAMALIER, J.P. et al. "Increased production of outer membrane vesicles by cultured freshwater bacteria in response to ultraviolet radiation" <i>Microbiological Research</i> , Vol. 194, 03 November 2016 (2016-11-03), pp. 38-46	23-45, 57-78, 90-119, 124-132
Y	易洁等 (YI, Jie et al.). "革兰氏阴性菌外膜囊泡作为亚单位疫苗的研究进展 (Advances in Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria as Sub-Unit Vaccines-A Review)" <i>Acta Microbiologica Sinica</i> , Vol. 56, No. 6, 11 January 2016 (2016-01-11), pp. 911-921	6-7, 12-21, 33, 36, 38-44, 46, 48-49, 68-77, 79, 81-82, 100-103, 105-109
A	WO 2012097185 A2 (THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND) 19 July 2012 (2012-07-19) entire document	1-132
A	WO 2008147816 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.) 04 December 2008 (2008-12-04) entire document	1-132

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/106654

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **33-42,46,72-74,76,79,104-106,108,111**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 33-42, 46, 72-74, 76, 79, 104-106, 108 and 111 all relate to disease treatment methods, and belong to the subject matter stipulated by Rule 39.1(iv). However, a search has been performed on the basis of disease treatment drug preparation and pharmaceutical uses.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/106654

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	1688334	A	26 October 2005	BR	0314094	A	16 November 2005
				US	2006166344	A1	27 July 2006
				ES	2520392	T3	11 November 2014
				EP	2258390	A1	08 December 2010
				AU	2003263534	A1	19 March 2004
				LU	92239	I2	04 September 2013
				GB	0220194	D0	09 October 2002
				EP	2258388	A1	08 December 2010
				JP	5808358	B2	10 November 2015
				DK	1864679	T3	25 August 2014
				EP	2258389	A1	08 December 2010
				SI	1864679	T1	30 October 2014
				CY	1115777	T1	25 January 2017
				EP	1534326	B1	04 July 2007
				AT	366117	T	15 July 2007
				DK	2258389	T3	26 August 2013
				US	2015258188	A1	17 September 2015
				JP	2013139471	A	18 July 2013
				SI	2258389	T1	31 July 2013
				PT	2258389	E	22 August 2013
				CA	2497165	C	20 October 2015
				EP	1864679	A2	12 December 2007
				DE	60314756	T2	06 March 2008
				EP	1864679	A3	02 April 2008
				ES	2483592	T3	06 August 2014
				MX	PA05002316	A	08 June 2005
				CY	1114570	T1	25 January 2017
				JP	2006503822	A	02 February 2006
				PT	1534326	E	17 October 2007
				WO	2004019977	A3	15 July 2004
				AU	2003263534	B2	05 August 2010
				EP	1534326	A2	01 June 2005
				WO	2004019977	A2	11 March 2004
				EP	2258388	B1	13 August 2014
				RU	2005108994	A	10 February 2006
				ES	2289351	T3	01 February 2008
				CN	102188700	A	21 September 2011
				RU	2325184	C2	27 May 2008
				EP	2258389	B1	05 June 2013
				SI	EP1864679	T1	30 October 2014
				DE	60314756	D1	16 August 2007
				DK	1534326	T3	22 October 2007
				PT	1864679	E	25 September 2014
				ES	2423019	T3	17 September 2013
				CA	2497165	A1	11 March 2004
				NZ	538673	A	30 April 2008
				EP	1864679	B1	18 June 2014
				CY	1107737	T1	18 April 2013
				JP	2010150287	A	08 July 2010
WO	2015144691	A1	01 October 2015	None			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/106654

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2012097185	A2	19 July 2012	PE	02222014	A1	12 March 2014
				WO	2012097185	A3	11 October 2012
				US	2014004178	A1	02 January 2014
				MX	2013008071	A	26 September 2013
				CO	6751260	A2	16 September 2013
				PE	20140222	A1	12 March 2014
				SG	191940	A1	30 August 2013
				AU	2012205498	A1	01 August 2013
				GB	2518813	A	08 April 2015
WO	2008147816	A2	04 December 2008	CN	110872587	A	10 March 2020
				US	2015307560	A1	29 October 2015
				US	9394344	B2	19 July 2016
				CN	101827943	B	13 April 2016
				CN	101827943	A	08 September 2010
				US	9051565	B2	09 June 2015
				WO	2008147816	A3	22 January 2009
				US	2010233195	A1	16 September 2010

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/106654

A. 主题的分类 A61K 39/095(2006.01)i; A61K 39/104(2006.01)i; A61K 39/112(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, STN; 膜囊泡, 外膜囊泡, MVs, membrane vesicles, 细菌, bacteria, 革兰氏阳性, gram-positive, 革兰氏阴性, gram-negative, 金黄色葡萄球菌, staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa, 铜绿假单胞菌, 电离射线, 电离辐射, 辐照, 电离辐照, ionizing radiation, ionization radiation, γ射线, X射线, γ-rays, X-rays, Co60, 高速离心, high-speed centrifugation, 超高速离心, extra-high speed centrifugation		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 1688334 A (启龙有限公司) 2005年 10月 26日 (2005 - 10 - 26) 说明书第2页第2段至第5页	1-5, 8-11, 22, 34-35, 37, 45, 47, 50-56, 78, 80, 83-89, 104, 110-111, 120-123
Y	CN 1688334 A (启龙有限公司) 2005年 10月 26日 (2005 - 10 - 26) 说明书第2页第2段至第5页	6-7, 12-21, 23-46, 48-49, 57-79, 81-82, 90-110, 112-119, 124-132
X	WO 2015144691 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA) 2015年 10月 1日 (2015 - 10 - 01) 说明书摘要, 第15页第27行至16页, 第21页第20-23行, 第24页第18行至26页	47
Y	WO 2015144691 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA) 2015年 10月 1日 (2015 - 10 - 01) 说明书摘要, 第15页第27行至16页, 第21页第20-23行, 第24页第18行至26页	48-49
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2020年 4月 26日		国际检索报告邮寄日期 2020年 5月 21日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 张蕾 电话号码 86-(10)-53962037

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CAI, W. 等. "Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based" Diagnostic Pathology, 第13卷, 2018年 12月 31日 (2018 - 12 - 31), 第95篇, 第1-12页	6-7, 12-21, 33, 36, 38-44, 46, 48-49, 68-77, 79, 81-82, 100- 103, 105-109
Y	GAMALIER, J.P. 等. "Increased production of outer membrane vesicles by cultured freshwater bacteria in response to ultraviolet radiation" Microbiological Research, 第194卷, 2016年 11月 3日 (2016 - 11 - 03), 第38-46页	23-45, 57-78, 90-119, 124-132
Y	易洁等. "革兰氏阴性菌外膜囊泡作为亚单位疫苗的研究进展" 微生物学报, 第56卷, 第6期, 2016年 1月 11日 (2016 - 01 - 11), 第911-921页	6-7, 12-21, 33, 36, 38-44, 46, 48-49, 68-77, 79, 81-82, 100- 103, 105-109
A	WO 2012097185 A2 (THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND) 2012年 7月 19日 (2012 - 07 - 19) 全文	1-132
A	WO 2008147816 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2008年 12月 4日 (2008 - 12 - 04) 全文	1-132

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 33-42, 46, 72-74, 76, 79, 104-106, 108, 111
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求33-42, 46, 72-74, 76, 79, 104-106, 108, 111均涉及疾病治疗方法，属于细则第39条（iv）规定的主题，但是基于制备治疗疾病的药物及制药用途进行检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/106654

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1688334	A	2005年 10月 26日	BR	0314094	A	2005年 11月 16日
				US	2006166344	A1	2006年 7月 27日
				ES	2520392	T3	2014年 11月 11日
				EP	2258390	A1	2010年 12月 8日
				AU	2003263534	A1	2004年 3月 19日
				LU	92239	I2	2013年 9月 4日
				GB	0220194	D0	2002年 10月 9日
				EP	2258388	A1	2010年 12月 8日
				JP	5808358	B2	2015年 11月 10日
				DK	1864679	T3	2014年 8月 25日
				EP	2258389	A1	2010年 12月 8日
				SI	1864679	T1	2014年 10月 30日
				CY	1115777	T1	2017年 1月 25日
				EP	1534326	B1	2007年 7月 4日
				AT	366117	T	2007年 7月 15日
				DK	2258389	T3	2013年 8月 26日
				US	2015258188	A1	2015年 9月 17日
				JP	2013139471	A	2013年 7月 18日
				SI	2258389	T1	2013年 7月 31日
				PT	2258389	E	2013年 8月 22日
				CA	2497165	C	2015年 10月 20日
				EP	1864679	A2	2007年 12月 12日
				DE	60314756	T2	2008年 3月 6日
				EP	1864679	A3	2008年 4月 2日
				ES	2483592	T3	2014年 8月 6日
				MX	PA05002316	A	2005年 6月 8日
				CY	1114570	T1	2017年 1月 25日
				JP	2006503822	A	2006年 2月 2日
				PT	1534326	E	2007年 10月 17日
				WO	2004019977	A3	2004年 7月 15日
				AU	2003263534	B2	2010年 8月 5日
				EP	1534326	A2	2005年 6月 1日
				WO	2004019977	A2	2004年 3月 11日
				EP	2258388	B1	2014年 8月 13日
				RU	2005108994	A	2006年 2月 10日
				ES	2289351	T3	2008年 2月 1日
				CN	102188700	A	2011年 9月 21日
				RU	2325184	C2	2008年 5月 27日
				EP	2258389	B1	2013年 6月 5日
				SI	EP1864679	T1	2014年 10月 30日
				DE	60314756	D1	2007年 8月 16日
				DK	1534326	T3	2007年 10月 22日
				PT	1864679	E	2014年 9月 25日
				ES	2423019	T3	2013年 9月 17日
				CA	2497165	A1	2004年 3月 11日
				NZ	538673	A	2008年 4月 30日
				EP	1864679	B1	2014年 6月 18日
				CY	1107737	T1	2013年 4月 18日
				JP	2010150287	A	2010年 7月 8日
WO	2015144691	A1	2015年 10月 1日	无			

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/106654

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2012097185	A2	2012年 7月 19日	PE	02222014	A1	2014年 3月 12日
				WO	2012097185	A3	2012年 10月 11日
				US	2014004178	A1	2014年 1月 2日
				MX	2013008071	A	2013年 9月 26日
				CO	6751260	A2	2013年 9月 16日
				PE	20140222	A1	2014年 3月 12日
				SG	191940	A1	2013年 8月 30日
				AU	2012205498	A1	2013年 8月 1日
				GB	2518813	A	2015年 4月 8日
WO	2008147816	A2	2008年 12月 4日	CN	110872587	A	2020年 3月 10日
				US	2015307560	A1	2015年 10月 29日
				US	9394344	B2	2016年 7月 19日
				CN	101827943	B	2016年 4月 13日
				CN	101827943	A	2010年 9月 8日
				US	9051565	B2	2015年 6月 9日
				WO	2008147816	A3	2009年 1月 22日
				US	2010233195	A1	2010年 9月 16日