



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110196337 A

(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201910561186.0

(22)申请日 2019.06.26

(71)申请人 四川农业大学

地址 611130 四川省成都市温江区惠民路
211号

(72)发明人 杨光友 刘俞辰 古小彬 谢跃

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 刘猛

(51)Int.Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,公开了多头带绦虫Antigen B作为脑多头蚴病诊断抗原等一系列相关应用,相关实验结果显示,多头带绦虫Antigen B能被感染脑多头蚴的山羊血清所识别而不与阴性血清反应,具有良好的免疫原性和反应原性;同时在间接ELISA方法中表现出较高敏感性和特异性,且相对其他蛋白具有较好的热稳定性,种种结果证明多头带绦虫Antigen B可以作为脑多头蚴病的诊断抗原,以及应用到检测试剂盒中。

1. 一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒,其特征在于,包括包被有多头带绦虫Antigen B的固相载体。

2. 根据权利要求1所述ELISA试剂盒,其特征在于,还包括酶标二抗、洗涤液、显色液、封闭液、稀释液、终止液中的一种或两种以上。

3. 根据权利要求2所述ELISA试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗为HRP标记的山羊或绵羊抗兔二抗IgG。

4. 根据权利要求2所述ELISA试剂盒,其特征在于,所述洗涤液为PBS-T洗涤液。

5. 根据权利要求2所述ELISA试剂盒,其特征在于,所述显色液为TMB显色液。

6. 根据权利要求2所述ELISA试剂盒,其特征在于,所述封闭液为脱脂牛奶。

7. 根据权利要求2所述ELISA试剂盒,其特征在于,所述稀释液为PBS。

8. 根据权利要求2所述ELISA试剂盒,其特征在于,所述终止液为硫酸溶液。

9. 根据权利要求1所述ELISA试剂盒,其特征在于,所述多头带绦虫Antigen B的序列如SEQ ID NO:1所示。

一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 脑多头蚴病(Cerebral coenurosis)是多头带绦虫(*Taenia multiceps*)的中绦期幼虫所引起的一种对牛羊危害严重的寄生虫病。脑多头蚴主要寄生于牛羊的中枢神经系统,也可寄生于皮下或肌肉组织,在误食多头带绦虫虫卵的情况下人类也可以充当中间宿主。这种疾病常导致牛羊的直接死亡,给欧洲、美国、非洲和亚洲的畜牧业造成巨大的经济损失,对感染动物的准确诊断是目前研究的重点方向之一。

[0003] 针对脑多头蚴病的诊断方法包括解剖学、影像学和实验室诊断。随着科学技术的发展,聚合酶链式反应(PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)也逐步被应用于该病的临床诊断中。近年来,已报道基于多头带绦虫重组抗原(Tm-P2、Tm-HSP70、Tm-GP50、Tm-GST和Tm-HSP60)的ELISA诊断方法,取得了良好的检测效果,但用于生产的抗原所具备的热稳定性一直有待改善。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒,使得所述试剂盒在检测时具备较高的特异性和敏感性。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒,包括包被有多头带绦虫Antigen B(Tm-AgB)的固相载体。在本发明具体实施方式中,所述固相载体可选择为96孔培养板或与其相似的固相载体,所述多头带绦虫Antigen B包被浓度为 $1\mu\text{g}/\text{孔}$,可采用包被液包被于载体上,包被液由 1.45g 碳酸氢钠和 0.8g 碳酸钠,溶于适量去离子水,调pH至9.6,定容获得。

[0007] 在确定了试剂盒核心组分后,所述ELISA试剂盒还包括酶标二抗、洗涤液、显色液、封闭液、稀释液、终止液中的一种或两种以上。

[0008] 其中,所述酶标二抗优选为HRP标记的山羊或绵羊抗兔二抗IgG,在本发明具体实施方式中,所述酶标二抗采用购自于武汉博士德生物工程有限公司的产品,酶标二抗稀释比例为1:2000;

[0009] 所述洗涤液优选为PBS-T洗涤液,在本发明具体实施方式中,所述PBS-T洗涤液组成为: 8gNaCl , 0.2gKCl , $1.42\text{gNa}_2\text{HPO}_4$, $0.27\text{gKH}_2\text{PO}_4$,溶于 800mL 去离子水中,加入 $0.5\text{mLTween}20$,定溶至 1L ;所述显色液优选为TMB显色液;

[0010] 所述封闭液优选为脱脂牛奶,在本发明具体实施方式中,所述脱脂牛奶浓度为5%。

[0011] 所述终止液优选为硫酸溶液,浓度优选为 2mol/L ;配制方法为 178mL 去离子水中缓慢滴加 21.7mL 的98%的浓硫酸,冷却至室温, 4°C 保存;

[0012] 所述稀释液优选为PBS;配制方法为 8gNaCl , 0.2gKCl , $1.42\text{gNa}_2\text{HPO}_4$, $0.27\text{gKH}_2\text{PO}_4$,

溶于800mL去离子水中,定溶至1L,灭菌后,室温保存。

[0013] 在本文中,多头带绦虫Antigen B可以是非天然的,例如是合成的或者由人工载体表达的(业内常称为重组蛋白rTm-AgB)。术语“非天然的”是指目标物质不是自然界天然存在的,这并不排除所述非天然物质与天然存在的物质具有相同的结构和/或组成。

[0014] 抗原B(Antigen B)是一种绦虫所特有的一种脂蛋白,Monteriro等发现AgB的3个亚基AgB8/1、AgB8/2和AgB8/3分子可自发聚合成120~120kDa的寡聚体,该寡聚体对热稳定,具有螺旋环状二色光谱特性,类似天然Ag B。现有研究发现表明了Antigen B相对多头带绦虫其他蛋白具有很好的热稳定性,但是Antigen B在脑多头蚴病中的相关研究尚未见报道。

[0015] 本发明通过原核表达得到重组多头带绦虫Antigen B(rTm-AgB,其和Tm-AgB具备完全相同的氨基酸序列,如SEQ ID NO:1所示),对其进行免疫印迹,ELISA以及诊断方法的建立。免疫印迹结果显示重组抗原能够被感染脑多头蚴的山羊血清所识别产生特异条带,而对照组阴性血清无反应,说明重组抗原具有较强的免疫反应性和良好的免疫原性。

[0016] 间接ELISA结果显示,利用rTm-AgB建立的ELISA方法敏感性高达95.8%(23/24),特异性为87.5%(21/24),与莫尼茨绦虫、肝片吸虫以及捻转血矛线虫中各3份血清产生交叉反应,与泡状带绦虫中2份血清产生交叉反应,与细粒棘球绦虫8份血清产生交叉反应。与其进行比较的rTm-TPx的敏感性较低仅为75.0%(18/24),特异性为91.7%(22/24);rTm-HSP70的敏感性为87.5%(21/24),特异性为83.3%(20/24);而rTm-GST的敏感性为83.3%(20/24),特异性为91.7%(22/24);综上所述,rTm-AgB同时具有较高的敏感性和特异性,且相对其他蛋白具有较好的热稳定性,具有较好的诊断效果,适合作为脑多头蚴病的诊断抗原以及作为诊断抗原制备相关的检测试剂盒。

[0017] 由以上技术方案可知,本发明提供了多头带绦虫Antigen B作为脑多头蚴病诊断抗原等一系列相关应用,相关实验结果显示,多头带绦虫Antigen B能被感染脑多头蚴的山羊血清所识别而不与阴性血清反应,具有良好的免疫原性和反应原性;同时在间接ELISA方法中表现出较高敏感性和特异性,且相对其他蛋白具有较好的热稳定性,种种结果证明多头带绦虫Antigen B可以作为脑多头蚴病的诊断抗原,以及应用到检测试剂盒中。

附图说明

[0018] 图1所示为Tm-AgB的SDS-PAGE和免疫印迹分析;其中,M:蛋白质标准品;A:纯化后的重组蛋白rTm-AgB;B:纯化后的重组蛋白rTm-AgB与感染脑多头蚴病的山羊血清的反应;C:重组蛋白与阴性山羊血清反应;

[0019] 图2所示为间接ELISA方法的敏感性、特异性及交叉反应情况;图中灰色水平线代表间接ELISA方法的临界值;使用SPSS version 20.0进行统计学分析,不同血清组之间的差异采用曼-惠特尼U检验方法统计;P值小于0.05表示具有统计学意义。

具体实施方式

[0020] 本发明公开了一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述试剂盒已经通过实施例

进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0021] 本发明通过提取多头带绦虫成虫、原头节和六钩蚴总RNA,并逆转录为cDNA,从cDNA中扩增Tm-AgB基因。经T克隆后,将扩增产物以酶切连接的方式导入表达载体中,以大肠杆菌进行原核表达获得重组的rTm-AgB。

[0022] 脑多头蚴包囊从四川省自然感染的山羊中获得。在无菌条件下,使用一次性注射器抽取包囊囊液,用3000rpm离心5min,后用灭菌生理盐水和PBS分别洗涤3次,获得原头节。多头带绦虫成虫取自4只人工感染20000个原头蚴30天的2月龄犬。六钩蚴由胰蛋白酶处理成虫新鲜孕卵节片中的虫卵后释放。

[0023] 以下就本发明所提供的一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒做进一步说明。

[0024] 实施例1:基因扩增

[0025] 1、多头带绦虫总RNA的提取与cDNA合成

[0026] 取出液氮保存的多头带绦虫成虫、原头节和六钩蚴,用研钵将其磨碎,随后参照天根的动物组织RNA提取试剂盒说明书提取总RNA。参照索莱宝哺乳动物蛋白提取试剂盒说明书从成虫中提取总蛋白。

[0027] 2、多头带绦虫Tm-AgB基因的扩增

[0028] Tm-AgB的引物参照转录组数据Unigene17133,,用Primer Premier 5.0软件设的引物,所有引物由上海生工合成:

[0029] Tm-AgB上游:5'-CGGGATCCATGAAAGCCTACATTGTT-3' BamHI

[0030] Tm-AgB下游:5'-CCAAGCTTCTAGTTCTCCTCATCCAT-3' HindIII

[0031] 扩增程序见表1:

[0032] 表1

[0033]

步骤	时间	温度
预变性	5min	95℃
变性	30sec	95℃
退火	30sec	55-60℃
延伸	40sec	72℃
Gotostep2		38cycle
延伸	10min	72℃
Forever		8℃

[0034]

[0035] 3、目的基因的克隆与测序

[0036] 将上述PCR产物按天根胶回收试剂盒说明书进行胶回收,将目的基因与pMD19-T载体连接,并转入DH5α大肠杆菌并测序。

[0037] 4、Tm-AgB基因的扩增和基本理化属性

[0038] 以多头带绦虫原头节的cDNA为模板扩增出一条260bp左右的条带,经测序得到的序列与转录组中Tm-AgB(Unigene17133)序列同源性达到100%。

[0039] Tm-AgB序列中的开放阅读框包含261个编码86个氨基酸多肽(最后3个碱基为终止密码子,不编码氨基酸)。信号肽被预测出现在该序列的第1到20个氨基酸处,并且似乎具有跨膜区域。预测的Tm-AgB的亚细胞定位显示该蛋白属于分泌蛋白。

[0040] 5、重组质粒的构建及鉴定

[0041] 克隆测序鉴定正确后,分别提取pET-32a菌株和目的基因的质粒,并以BamHI和HindIII快切酶进行双酶切,回收酶切产物。将产物片段和pET-32a(+)表达载体进行连接、转化和双酶切鉴定。

[0042] 6、重组质粒在大肠杆菌中的表达与鉴定

[0043] 6.1、重组蛋白的表达与纯化

[0044] 将测序正确的重组质粒pET32a-Tm-AgB转入BL21(DE3)表达菌。

[0045] 将表达菌接种于两瓶含100mL的新鲜的LB(含AMP 100 μ g/mL)培养液中,37 $^{\circ}$ C摇床培养6h(160r/min),至菌液OD₅₉₀为0.8时后加入诱导剂IPTG(1mmol/L),37 $^{\circ}$ C诱导6h(160r/min),另一瓶不加IPTG做对照培养。

[0046] 分别取有到过后的菌液1.5mL于两个新EP管中,4 $^{\circ}$ C离心1min(12,000r/min)收集菌体,分别加入10 μ L 5 $\times$ SDS上样Buffer和40 μ L PBS溶液,充分混匀。

[0047] 沸水煮10min,以使菌体充分破裂,4 $^{\circ}$ C离心10min(12,000r/min),取上清进行SDS-PAGE。

[0048] 用考马斯亮蓝染色1h,脱色后观察表达情况。

[0049] 6.2、表达蛋白的可溶性分析

[0050] 将含有重组质粒Pet32a-Tm-AgB的表达菌接种于500mL含氨苄的液体培养基中,37 $^{\circ}$ C培养(160rpm/min)至OD₅₉₀为0.8左右,加入最佳IPTG浓度,诱导6h。

[0051] 把菌液离心10min(8000rpm),弃上清,沉淀用裂解液(20mM Tris-HCl, pH=8.0)悬浮,超声破碎菌体。

[0052] 将破碎后的菌体裂解液在4 $^{\circ}$ C条件下离心10min(12,000rpm),分离沉淀与上清;沉淀加入适量的8M尿素溶解。

[0053] 上清和沉淀各取40 μ L,分别加10 μ L 5 $\times$ SDS凝胶上样缓冲液,煮沸10min,离心10min(12,000rpm),进行SDS-PAGE电泳,分析是否为可溶性表达。

[0054] 目的基因片段成功连接在pET-32a载体上,转化进入BL21大肠杆菌中诱导表达。在37 $^{\circ}$ C条件下,用1mM IPTG诱导6h时表达量最大。表达的重组蛋白大小为26kDa左右(包含18kDa左右的标签蛋白),符合预期大小。可溶性分析结果显示,表达为可溶性蛋白。纯化后的重组蛋白为单一条带(图1)。

[0055] 实施例2:免疫印迹

[0056] 用免疫印迹检测rTm-AgB与患病动物血清的免疫反应性,具体步骤如下:

[0057] (1)蛋白质电泳结束后,取蛋白质所在的相应凝胶部位,放入转膜缓冲液中进行平衡,共3次,每次4min。

[0058] (2)将硝酸纤维素滤膜(NC膜)和24层滤纸置于转移缓冲液中浸泡5min。

[0059] (3)按顺序将阴极电极板、24层滤纸、凝胶、NC膜、24层滤纸置于Bio-Rad半干式转印槽内,盖上阳极电极板。

[0060] (4)将电转移装置接到电转仪上,并加入转移缓冲液35mA转移30min。

- [0061] (5) 转移结束后,取出NC膜,浸泡在5%脱脂奶粉的TBST中,4℃封闭过夜。
- [0062] (6) 封闭结束后,剪开NC膜,阴性和阳性分开放置,加入1:1000稀释的一抗,室温孵育2h后,倒掉一抗,用TBST快速洗膜3次,5min/次。
- [0063] (7) 将HRP标记的goat-anti-rabbit或rabbit-anti-goat IgG按1:1000稀释后,加入NC膜,室温孵育2h后,倒掉二抗,用TBST快速洗膜3次,5min/次。
- [0064] (8) 将NC膜置于平皿中,以新鲜底物显色液冲洗直至显色。
- [0065] (9) 显色后,用双蒸水冲洗NC膜终止显色,并对结果进行拍照记录。
- [0066] 结果显示重组抗原能够被感染脑多头蚴的山羊血清所识别产生特异条带,而对照组阴性血清无反应,说明重组抗原具有较强的免疫反应性和良好的免疫原性(图1)。
- [0067] 实施例3:间接ELISA方法的建立
- [0068] 1、间接ELISA操作步骤
- [0069] (1) 以抗原包被液按比列稀释,每孔100μL加入96酶标板中进行包被;
- [0070] (2) 倒掉包被液,拍干孔内液体,用PBST洗涤,每次5min,重复四次;
- [0071] (3) 加入封闭液封闭。
- [0072] (4) 洗涤后用PBS按比例稀释血清后,每孔100μL加入酶标孔孵育,倒掉液体。
- [0073] (5) 洗涤后每孔加入100μL稀释好的HRP标记的山羊或绵羊抗兔二抗,孵育。
- [0074] (6) 在避光条件下向孔中加入可溶性单组分底物TMB进行显色反应;
- [0075] (7) 在孔中加入100μL 2M H2SO4终止反应,在紫外吸光度为450nm时测定其OD值。
- [0076] 可根据本实施例的间接ELISA试剂组成一种试剂盒。
- [0077] 2、条件优化
- [0078] (1) 用棋盘滴定法确定最佳抗原和血清稀释浓度,设置6个抗原浓度梯度,血清从1:20到1:640作倍比稀释,以P/N最大的条件作为最佳。
- [0079] (2) 最佳封闭液的确定,分别用1%BSA,5%BSA,1%脱脂牛奶,5%脱脂牛奶封闭,以P/N最大的条件作为最佳。
- [0080] (3) 阴、阳性血清反应时间的确定,按照确定的条件来筛选阴、阳性血清的最佳孵育时间,设为37℃,0.5h、1h、1.5h三个组,以P/N最大的浓度作为最佳。
- [0081] (4) 二抗作用的最佳浓度的确定,分别设1:2000,1:3000,1:4000,1:5000四个稀释浓度进行摸索,以P/N最大的条件作为最佳。
- [0082] 以rTm-AgB建立的间接ELISA摸索最佳反应条件结果显示,最佳包被条件是4℃过夜,抗原最佳浓度为1μg/每孔,最佳血清稀释浓度为1:640,最佳封闭液和封闭条件是5%脱脂奶粉37℃封闭1h,血清孵育最佳时间是37℃1h,二抗孵育最佳时间是37℃1.5h,二抗最佳稀释浓度为1:2000时,底物显色的最佳条件是37℃15min,在以上条件下,测得阴阳性血清的P/N值达到最高,为2.23。
- [0083] 3、临界值的确定
- [0084] 在最佳条件下,测定24份山羊脑多头蚴病阴性血清的OD450。设置三个重复。按照临界值=平均值+3倍标准差计算。得到rTm-AgB的临界值为0.309,所有间接ELISA方法的板内及板间变异系数均小于10%。
- [0085] 4、特异性、敏感性以及交叉反应试验
- [0086] 用建立的间接ELISA对剖解确认患脑多头蚴病的24份山羊血清进行检测,检测其

敏感性。敏感性计算公式为： $\text{ELISA结果阳性份数} \times 100 / \text{实际阳性份数}$ 。

[0087] 用建立的间接ELISA对剖解确认无寄生虫病感染的24份山羊血清进行检测，检测其特异性。特异性计算公式为： $\text{ELISA结果阴性份数} \times 100 / \text{实际阴性份数}$ 。同时，用60份血清样本分别来自剖解确认感染细粒棘球绦虫(12份)和莫尼茨绦虫(12份)的绵羊血清，以及确认感染了泡状带绦虫(12份)、肝片吸虫(12份)和捻转血矛线虫(12份)的山羊血清，进行交叉反应试验。

[0088] 利用rTm-AgB建立的ELISA方法敏感性高达95.8% (23/24)，特异性为87.5% (21/24)，与莫尼茨绦虫、肝片吸虫以及捻转血矛线虫中各3份血清产生交叉反应，与泡状带绦虫中2份血清产生交叉反应，与细粒棘球绦虫交叉反应较为严重(8份)。与它们进行比较的rTm-TPx的敏感性较低仅为75.0% (18/24)，特异性为91.7% (22/24)；rTm-HSP70的敏感性为87.5% (21/24)，特异性为83.3% (20/24)；而rTm-GST的敏感性为83.3% (20/24)，特异性为91.7% (22/24)，交叉反应情况与上述差异不大(图2)。考虑到总体数据情况，rTm-AgB同时具有较高的敏感性和特异性，且相对其他蛋白具有较好的热稳定性，具有较好的诊断效果，适合作为脑多头蚴病的诊断抗原以及作为诊断抗原制备相关的检测试剂盒。

[0089] 5、批内、批间重复性试验

[0090] 取同一批次包被的板子，检测3份剖解确定为脑多头蚴病阳性的山羊血清，每份设置3个重复孔，按照已经建立的ELISA方法，进行批内重复试验，计算变异系数，检测该方法的批内重复性。

[0091] 取3个批次包被的板子，在最佳条件下，检测3份脑多头蚴病阳性血清，每份设置3个重复孔，按照已经建立的ELISA方法，进行批间重复试验，计算变异系数，检测该方法的批间重复性。

[0092] 批间变异系数小于10%，批内变异系数小于5%，表明该试验具有良好的重复性。

[0093] 6、临床检测

[0094] 对100只来自四川省5个乡镇的山羊进行脑多头蚴感染情况调查，每个样本重复测三次，其中18份血清检测到相应抗体，判定为阳性。

[0095] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

序列表

<110> 四川农业大学

<120> 一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒

<130> MP1913049

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 86

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Met Lys Ala Tyr Ile Val Leu Ala Leu Ala Leu Val Ala Phe Val Ala

1 5 10 15

Val Ala Arg Ala Glu Glu Asp Ile Glu Ser Lys Ala Arg Asp Gly Val

20 25 30

Met Lys Ser Leu Ala Glu Leu Lys Asp Phe Phe Lys Asn Asp Pro Met

35 40 45

Gly Gln Lys Leu Ala Ser Ile Cys Lys Asp Leu Lys Asp Leu Phe Leu

50 55 60

Met Ala Lys Thr Lys Thr His Ser Ala Phe Asn Asp Tyr Ile Lys Arg

65 70 75 80

Leu Met Asp Glu Glu Asn

85

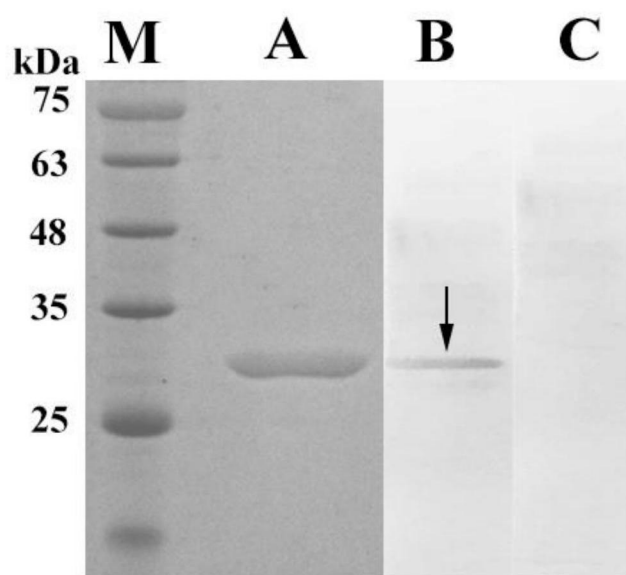


图1

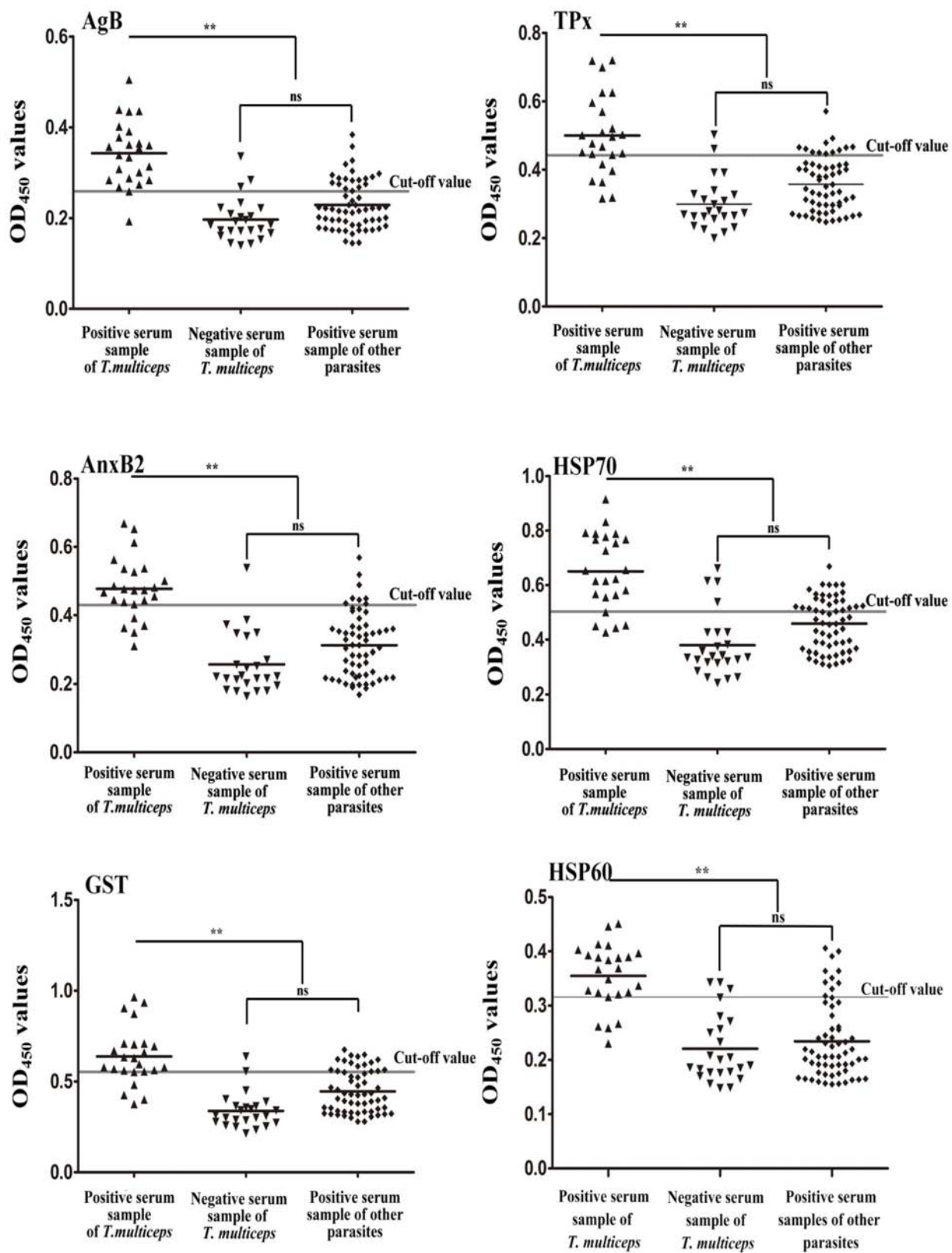


图2

专利名称(译)	一种诊断脑多头蚴病的ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN110196337A	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201910561186.0	申请日	2019-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
[标]发明人	杨光友 刘俞辰 古小彬 谢跃		
发明人	杨光友 刘俞辰 古小彬 谢跃		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54306 G01N33/92		
代理人(译)	刘猛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，公开了多头带绦虫Antigen B作为脑多头蚴病诊断抗原等一系列相关应用，相关实验结果显示，多头带绦虫Antigen B能被感染脑多头蚴的山羊血清所识别而不与阴性血清反应，具有良好的免疫原性和反应原性；同时在间接ELISA方法中表现出较高敏感性和特异性，且相对其他蛋白具有较好的热稳定性，种种结果证明多头带绦虫Antigen B可以作为脑多头蚴病的诊断抗原，以及应用到检测试剂盒中。

步骤	时间	温度
预变性	5min	95℃
变性	30sec	95℃
退火	30sec	55-60℃