



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110755605 A

(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201910914742.8

(22)申请日 2019.09.26

(71)申请人 天津市水产研究所

地址 300221 天津市河西区解放南路442号  
106室

(72)发明人 罗璋 张振国 郝爽 白晓慧  
冯守明

(74)专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司 12209

代理人 赵瑶瑶

(51)Int.Cl.

A61K 39/02(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

C12N 15/75(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

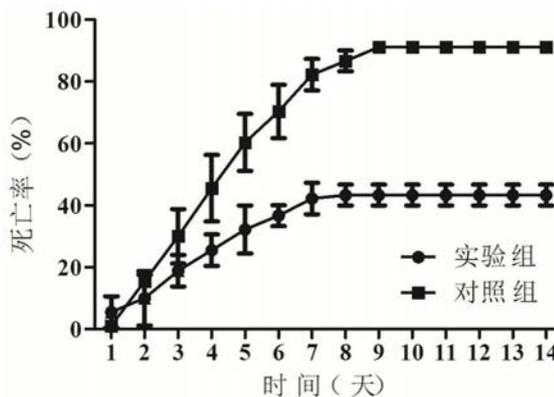
权利要求书2页 说明书8页  
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗、使用方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗,制备步骤如下:(1)分析柱状黄杆菌的保护性抗原基因lip的成熟肽段序列;(2)穿梭质粒的构建;(3)重组菌株的筛选;(4)重组菌株的培养;(5)制备成口服疫苗。本发明疫苗是一种口服疫苗,通过口服免疫的方式接种,比注射免疫和浸泡免疫疫苗使用方便,更节省劳动力,并具有不受鱼体大小限制的优点。



1. 一种柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗,其特征在于:制备步骤如下:

(1)分析柱状黄杆菌的保护性抗原基因lip的成熟肽段序列,按照枯草芽孢杆菌的密码子偏好性人工合成lip基因成熟肽段序列,在序列两端分别加入Pst I和SphI酶切位点,并通过在N端加入2个碱基确保序列不移码,在C段去掉了终止密码子TAA,合成后的lip基因序列为SEQ NO.1,共计760bp;

(2)将步骤(1)中人工合成后的lip基因序列用Pst I和SphI限制性内切酶双酶切后,与用相同限制性内切酶双酶切的载体pBE2R进行连接,构建穿梭质粒pBE2R-lip;

(3)将步骤(2)中构建的穿梭质粒pBE2R-lip转入枯草芽孢杆菌WB800菌株,筛选得到WB800 (pBE2R-lip) 菌株;

(4)将步骤(3)中筛选得到的WB800 (pBE2R-lip) 菌株按体积以1:100的接种量接种于含50μg/mL卡纳霉素的LB培养基中,37℃、200rpm/min培养48h后,离心收集细菌;

(5)将步骤(4)中收集到的细菌以 $3.0 \times 10^8$ CFU/饲料的浓度均匀喷洒至饲料中,阴干,制备成口服疫苗,即得柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗。

2. 根据权利要求1所述的柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗,其特征在于:具体制备步骤如下:

(1)从Genbank下载柱状黄杆菌lip基因序列,利用在线软件对其信号肽进行分析,获得lip基因的成熟肽段序列;根据枯草芽孢杆菌密码子的偏好性进行柱状黄杆菌lip基因成熟肽段的合成,在两端分别加入Pst I和SphI酶切位点,并通过在前端加入2个碱基确保序列不移码,去掉了终止密码子TAA,合成后序列如SEQ NO.1所示,共计760bp;

(2)将人工合成的lip基因片段进行双酶切

每20μL的酶切体系如下:

Lip 基因片段	16 μL
Pst I 20 U/μL	1 μL
SphI 20 U/μL	1 μL
10×buffer	2 μL

酶切三个小时后,65℃变性10min,电泳切胶回收;

(3)将双酶切后的表达片段和用同样的内切酶同步酶切的pBE2R载体连接,每10μL的连接体系如下:

酶切后的 lip 基因片段	6 μL
酶切后的 pBE2R 质粒	2 μL
T4 ligase 50 U/μL	1 μL
10×buffer	1 μL

16℃连接过夜;

(4)连接产物转化TOP10感受态细胞,PCR筛选重组克隆,挑选阳性克隆,测序检查基因序列的正确性;

(5)将阳性克隆株按体积以1:100的接种量接种于含50μg/mL卡纳霉素LB液体培养基中,

37℃、200rpm恒温摇床振荡培养至OD<sub>600</sub>为0.8~1.0,收集细菌,使用细菌质粒提取试剂盒提质粒pBE2R-lip;

(6)将枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株在含1μg/mL红霉素的LB平板上划线,37℃培养箱内培养过夜;次日挑取单菌落于含1μg/mL红霉素的LB培养液中,在37℃摇床200rpm振荡培养OD<sub>600</sub>为0.8~1.0,添加质量终浓度为1%的木糖,继续培养2h,制备成枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株的感受态细胞;

(7)将质粒pBE2R-lip转入枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>感受态细胞,PCR筛选重组克隆,挑选阳性克隆,构建了枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株;

(8)将枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株活化后,按体积以1:100的接种量的比例接种于含50μg/mL卡纳霉素的LB培养基,37℃、200rpm培养48h后,计算细菌的浓度,离心收集细菌;

(9)将收集的枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 用PBS调整浓度为 $3 \times 10^9$ CFU/mL;按质量比将1份菌液均匀喷洒在10份饲料表面,使饲料中枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 的含量为 $3 \times 10^8$ CFU/克;

(10)将喷洒了菌液的饲料阴干后,即为口服疫苗。

3. 如权利要求1或2所述的柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗在预防鱼柱状黄杆菌感染方面中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于:所述鱼为草鱼。

5. 如权利要求1或2所述的柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗的使用方法,其特征在于:步骤如下:

当年的鱼苗养至5-7cm时,采用所述的疫苗进行免疫,免疫方式为口服疫苗,按照草鱼体重2%的投喂量对草鱼进行投喂,连续免疫7天。

6. 根据权利要求5所述的柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗的使用方法,其特征在于:在首次免疫后,间隔2周后进行加强免疫一次,免疫剂量与第一次相同。

## 一种柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗、使用方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和水产技术领域,涉及水产动物免疫学,尤其是一种柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗、使用方法和应用。

### 背景技术

[0002] 柱状黄杆菌是一种世界范围的水生动物致病菌,为革兰氏阴性杆菌。其宿主范围极为广泛,可感染包括鲤科、鲈科、鲶科、鲑科、太阳科、鲷科等多个科的鱼类,几乎所有的淡水鱼都对其敏感。在我国,柱状黄杆菌主要危害草鱼、鳊鱼、斑点叉尾鮰、泥鳅、金鱼等鱼类,其引起的柱形病为淡水鱼类发病率最高的细菌性疾病,给我国水产养殖业造成了严重的危害。

[0003] 目前,主要通过使用抗生素和消毒剂等化学药物对柱形病进行防治,进行有一定的效果,但随着抗生素的长期使用和乱用所引发的问题已逐渐引起人们的重视。在挪威、美国、日本等水产发达国家,化学药物在水产养殖业中已逐渐被限用或禁用,开发新的防治方法迫在眉睫。其它防治途径相比,利用疫苗进行免疫防治的方法具有针对性强、效果显著、无毒无害、抗病周期长等不可替代的优势,符合高效、绿色、环保理念而日益受到人们的重视。

[0004] 关于柱状黄杆菌疫苗的研究,现有技术目前主要有三方面的报道:

[0005] (1) 柱状黄杆菌灭活疫苗

[0006] 将柱状黄杆菌菌株接种于shieh培养基中,25℃培养摇床培养至平台期后,离心收集细菌,用生理盐水稀释到一定浓度。在菌液中加入终浓度为2%的苯酚或者0.5%的福尔马林25℃灭活24h,即为柱状黄杆菌灭活疫苗。

[0007] (2) 柱状黄杆菌减毒活疫苗

[0008] 将柱状黄杆菌在含利福平的shieh培养基中反复传代,经过243次传代后,培养基中利福平的含量从5μg/mL逐渐上升至200μg/mL,柱状黄杆菌对利福平产生耐药性,柱状黄杆菌的致病性逐渐减弱,培养毒性减弱的柱状黄杆菌,用生理盐水调整细菌浓度,即为柱状黄杆菌减毒活疫苗。

[0009] (3) 柱状黄杆菌重组亚单位疫苗

[0010] 通过将柱状黄杆菌的保护性抗原基因进行PCR扩增,与表达载体进行连接后,转入大肠杆菌表达菌株DE3,利用IPTG对重组菌株进行诱导,收集诱导后的细菌进行超声破碎,对重组蛋白进行收集和纯化,稀释至一定浓度后,即为柱状黄杆菌重组亚单位疫苗。

[0011] 柱状黄杆菌灭活疫苗成分复杂,稳定性不强且在灭活过程中会导致部分蛋白免疫原性丧失而影响其免疫效果。柱状黄杆菌减毒活疫苗有回复突变的危险,存在安全隐患。柱状黄杆菌重组亚单位疫苗的制备比较繁琐,且需要注射免疫,在实际操作过程中存在困难。

[0012] 通过检索,发现如下一篇与本发明专利申请相关的专利公开文献:

[0013] 柱状黄杆菌基因重组疫苗的制备方法(CN103495159A),其步骤包括:(1)表达载体的构建;(2)目的蛋白的表达和纯化;(3)将纯化好的蛋白进行浓度调整,得到可直接使用的

柱状黄杆菌基因重组亚单位疫苗。本发明所制备的疫苗具有安全性高、免疫效果稳定、生产效率高等优点。

[0014] 通过对比,柱状黄杆菌基因重组疫苗的制备方法(CN103495159A)为注射型口服疫苗,需要通过对鱼体进逐尾注射,操作较为麻烦,工作量大,而本发明的为口服疫苗,通过投喂即可进行免疫,大大减少了工作量,提高了工作效率,本发明专利申请与上述专利公开文献存在本质的不同。

### 发明内容

[0015] 本发明目的在于克服现有技术中的不足之处,提供一种柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗、使用方法和应用,该疫苗是一种口服疫苗,通过口服免疫的方式接种,比注射免疫和浸泡免疫疫苗使用方便,更节省劳动力,并具有不受鱼体大小限制的优点。

[0016] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0017] 一种柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗,制备步骤如下:

[0018] (1)分析柱状黄杆菌的保护性抗原基因lip的成熟肽段序列,按照枯草芽孢杆菌的密码子偏好性人工合成lip基因成熟肽段序列,在序列两端分别加入Pst I和SphI酶切位点,并通过在N端加入2个碱基确保序列不移码,在C段去掉了终止密码子TAA,合成后的lip基因序列为SEQ NO.1,共计760bp;

[0019] (2)将步骤(1)中人工合成后的lip基因序列用Pst I和SphI限制性内切酶双酶切后,与用相同限制性内切酶双酶切的载体pBE2R进行连接,构建穿梭质粒pBE2R-lip;

[0020] (3)将步骤(2)中构建的穿梭质粒pBE2R-lip转入枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株,筛选得到WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株;

[0021] (4)将步骤(3)中筛选得到的WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株按体积以1:100的接种量接种于含50μg/mL卡纳霉素的LB培养基中,37℃、200rpm/min培养48h后,离心收集细菌;

[0022] (5)将步骤(4)中收集到的细菌以 $3.0 \times 10^8$ CFU/饲料的浓度均匀喷洒至饲料中,阴干,制备成口服疫苗,即得柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗。

[0023] 而且,具体制备步骤如下:

[0024] (1)从Genbank下载柱状黄杆菌lip基因序列,利用在线软件对其信号肽进行分析,获得lip基因的成熟肽段序列;根据枯草芽孢杆菌密码子的偏好性进行柱状黄杆菌lip基因成熟肽段的合成,在两端分别加入Pst I和SphI酶切位点,并通过在前端加入2个碱基确保序列不移码,去掉了终止密码子TAA,合成后序列如SEQ NO.1所示,共计760bp;

[0025] (2)将人工合成的lip基因片段进行双酶切

[0026] 每20μL的酶切体系如下:

	Lip 基因片段	16 μL
[0027]	Pst I 20 U/μL	1 μL
	SphI 20 U/μL	1 μL
	10×buffer	2 μL

[0028] 酶切三个小时后,65℃变性10min,电泳切胶回收;

[0029] (3)将双酶切后的表达片段和用同样的内切酶同步酶切的pBE2R载体连接,每10μL

的连接体系如下：

	酶切后的 lip 基因片段	6 $\mu\text{L}$
	酶切后的 pBE2R 质粒	2 $\mu\text{L}$
[0030]	T4 ligase 50 U/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
	10 $\times$ buffer	1 $\mu\text{L}$

[0031] 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜；

[0032] (4)连接产物转化TOP10感受态细胞,PCR筛选重组克隆,挑选阳性克隆,测序检查基因序列的正确性；

[0033] (5)将阳性克隆株按体积以1:100的接种量接种于含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡纳霉素LB液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200rpm恒温摇床振荡培养至OD<sub>600</sub>为0.8~1.0,收集细菌,使用细菌质粒提取试剂盒提质粒pBE2R-lip；

[0034] (6)将枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株在含1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素的LB平板上划线,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养过夜；次日挑取单菌落于含1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素的LB培养液中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床200rpm振荡培养OD<sub>600</sub>为0.8~1.0,添加质量终浓度为1%的木糖,继续培养2h,制备成枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株的感受态细胞；

[0035] (7)将质粒pBE2R-lip转入枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>感受态细胞,PCR筛选重组克隆,挑选阳性克隆,构建了枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株；

[0036] (8)将枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株活化后,按体积以1:100的接种量的比例接种于含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡纳霉素的LB培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200rpm培养48h后,计算细菌的浓度,离心收集细菌；

[0037] (9)将收集的枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 用PBS调整浓度为 $3 \times 10^9$ CFU/mL；按质量比将1份菌液均匀喷洒在10份饲料表面,使饲料中枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 的含量为 $3 \times 10^8$ CFU/克；

[0038] (10)将喷洒了菌液的饲料阴干后,即为口服疫苗。

[0039] 如上所述的柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗在预防鱼柱状黄杆菌感染方面的应用。

[0040] 而且,所述鱼为草鱼。

[0041] 如上所述的柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗的使用方法,步骤如下：

[0042] 当年的鱼苗养至5-7cm时,采用所述的疫苗进行免疫,免疫方式为口服疫苗,按照草鱼体重2%的投喂量对草鱼进行投喂,连续免疫7天。

[0043] 而且,在首次免疫后,间隔2周后进行加强免疫一次,免疫剂量与第一次相同。

[0044] 本发明取得的优点和积极效果为：

[0045] 1、本发明疫苗是一种口服疫苗,通过口服免疫的方式接种,比注射免疫和浸泡免疫疫苗使用方便,更节省劳动力,并具有不受鱼体大小限制的优点。

[0046] 2、本发明疫苗是一种以枯草芽孢杆菌为载体的疫苗,通过培养芽孢杆菌就能制备出相应的疫苗,具有生产成本低、效率高的特点。

[0047] 3、本发明疫苗能够有效减少由柱状黄杆菌所引发的柱形病而造成的渔业经济损失,也为今后开发鱼类基因工程多联疫苗奠定基础。

## 附图说明

[0048] 图1为本发明中质粒pBE2R-lip的双酶切验证图;其中,1.为酶切后,2.为酶切前;

[0049] 图2为本发明中阳性克隆的挑选图;

[0050] 图3为本发明中SDS-PAGE电泳图谱;其中,M,marker;1,WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株上清液48h样品;2,WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株上清液24h样品;3,WB<sub>800</sub> (pBE2R) 菌株上清液48h样品;4,WB<sub>800</sub> (pBE2R) 菌株上清液24h样品;5,WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株分泌液48h样品;6,WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株分泌液24h样品;7,WB<sub>800</sub> (pBE2R) 菌株分泌液48h样品;8,WB<sub>800</sub> (pBE2R) 菌株分泌液24h样品;

[0051] 图4为本发明中免疫印迹实验检测lip蛋白的分泌情况图;其中,M,marker;1,WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株上清液48h样品;2,WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株上清液24h样品;3,WB<sub>800</sub> (pBE2R) 菌株上清液48h样品;4,WB<sub>800</sub> (pBE2R) 菌株上清液24h样品;5,WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株分泌液48h样品;6,WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株分泌液24h样品;7,WB<sub>800</sub> (pBE2R) 菌株分泌液48h样品;8,WB<sub>800</sub> (pBE2R) 菌株分泌液24h样品;

[0052] 图5为本发明中用柱状黄杆菌G4株做人工感染试验,人工感染后14d内实验组和对照组草鱼的累计死亡率图。

## 具体实施方式

[0053] 下面详细叙述本发明的实施例,需要说明的是,本实施例是叙述性的,不是限定性的,不能以此限定本发明的保护范围。

[0054] 本发明中所使用的原料,如无特殊说明,均为常规的市售产品;本发明中所使用的方法,如无特殊说明,均为本领域的常规方法。

[0055] 一种柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗,制备步骤如下:

[0056] (1)分析柱状黄杆菌的保护性抗原基因lip的成熟肽段序列,按照枯草芽孢杆菌的密码子偏好性人工合成lip基因成熟肽段序列,在序列两端分别加入Pst I和SphI酶切位点,并通过在N端加入2个碱基确保序列不移码,在C段去掉了终止密码子TAA,合成后的lip基因序列为SEQ NO.1,共计760bp;

[0057] (2)将步骤(1)中人工合成后的lip基因序列用Pst I和SphI限制性内切酶双酶切后,与用相同限制性内切酶双酶切的载体pBE2R进行连接,构建穿梭质粒pBE2R-lip;

[0058] (3)将步骤(2)中构建的穿梭质粒pBE2R-lip转入枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株,筛选得到WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株;

[0059] (4)将步骤(3)中筛选得到的WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株按体积以1:100的接种量接种于含50μg/mL卡纳霉素的LB培养基中,37℃、200rpm/min培养48h后,离心收集细菌;

[0060] (5)将步骤(4)中收集到的细菌以 $3.0 \times 10^8$ CFU/饲料的浓度均匀喷洒至饲料中,阴干,制备成口服疫苗,即得柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗。

[0061] 较优地,具体制备步骤如下:

[0062] (1)从Genbank下载柱状黄杆菌lip基因序列,利用在线软件对其信号肽进行分析,获得lip基因的成熟肽段序列;根据枯草芽孢杆菌密码子的偏好性进行柱状黄杆菌lip基因成熟肽段的合成,在两端分别加入Pst I和SphI酶切位点,并通过在前端加入2个碱基确保序列不移码,去掉了终止密码子TAA,合成后序列如SEQ NO.1所示,共计760bp;

[0063] (2)将人工合成的lip基因片段进行双酶切

[0064] 每20 $\mu$ L的酶切体系如下:

	Lip 基因片段	16 $\mu$ L
	Pst I 20 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
[0065]	SphI 20 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
	10 $\times$ buffer	2 $\mu$ L

[0066] 酶切三个小时后,65 $^{\circ}$ C变性10min,电泳切胶回收;

[0067] (3)将双酶切后的表达片段和用同样的内切酶同步酶切的pBE2R载体连接,每10 $\mu$ L的连接体系如下:

	酶切后的 lip 基因片段	6 $\mu$ L
	酶切后的 pBE2R 质粒	2 $\mu$ L
[0068]	T4 ligase 50 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
	10 $\times$ buffer	1 $\mu$ L

[0069] 16 $^{\circ}$ C连接过夜;

[0070] (4)连接产物转化TOP10感受态细胞,PCR筛选重组克隆,挑选阳性克隆,测序检查基因序列的正确性;

[0071] (5)将阳性克隆株按体积以1:100的接种量接种于含50 $\mu$ g/mL卡纳霉素LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200rpm恒温摇床振荡培养至OD<sub>600</sub>为0.8~1.0,收集细菌,使用细菌质粒提取试剂盒提质粒pBE2R-lip;

[0072] (6)将枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株在含1 $\mu$ g/mL红霉素的LB平板上划线,37 $^{\circ}$ C培养箱内培养过夜;次日挑取单菌落于含1 $\mu$ g/mL红霉素的LB培养液中,在37 $^{\circ}$ C摇床200rpm振荡培养OD<sub>600</sub>为0.8~1.0,添加质量终浓度为1%的木糖,继续培养2h,制备成枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株的感受态细胞;

[0073] (7)将质粒pBE2R-lip转入枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>感受态细胞,PCR筛选重组克隆,挑选阳性克隆,构建了枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株;

[0074] (8)将枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株活化后,按体积以1:100的接种量的比例接种于含50 $\mu$ g/mL卡纳霉素的LB培养基,37 $^{\circ}$ C、200rpm培养48h后,计算细菌的浓度,离心收集细菌;

[0075] (9)将收集的枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 用PBS调整浓度为 $3 \times 10^9$ CFU/mL;按质量比将1份菌液均匀喷洒在10份饲料表面,使饲料中枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 的含量为 $3 \times 10^8$ CFU/克;

[0076] (10)将喷洒了菌液的饲料阴干后,即为口服疫苗。

[0077] 如上所述的柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗在预防鱼柱状黄杆菌感染方面的应用。

[0078] 较优地,所述鱼为草鱼。

[0079] 如上所述的柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗的使用方法,步骤如下:

[0080] 当年的鱼苗养至5-7cm时,采用所述的疫苗进行免疫,免疫方式为口服疫苗,按照

草鱼体重2%的投喂量对草鱼进行投喂,连续免疫7天。

[0081] 较优地,在首次免疫后,间隔2周后进行加强免疫一次,免疫剂量与第一次相同。

[0082] 本发明的相关制备及检测如下:

[0083] 一、枯草芽孢杆菌WB800 (pBE2R-lip) 菌株的构建

[0084] (1) 从Genbank下载柱状黄杆菌lip基因序列,利用在线软件对其信号肽进行分析,获得lip基因的成熟肽段序列。根据枯草芽孢杆菌密码子的偏好性进行柱状黄杆菌lip基因成熟肽段的合成,在两端分别加入Pst I和SphI酶切位点,并通过在前端加入2个碱基确保序列不移码,去掉了终止密码子TAA,合成后序列如SEQ NO.1所示,共计760bp。

[0085] (2) 将人工合成的lip基因片段进行双酶切

[0086] 酶切体系如下:

	Lip 基因片段	16 $\mu$ L
[0087]	Pst I (20 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
	SphI (20 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
	10 $\times$ buffer	2 $\mu$ L

[0088] 酶切三个小时后。65 $^{\circ}$ C变性10min,电泳切胶回收。

[0089] (3) 将双酶切后的表达片段和用同样的内切酶同步酶切的pBE2R载体连接。连接体系如下:

	酶切后的 lip 基因片段	6 $\mu$ L
[0090]	酶切后的 pBE2R 质粒	2 $\mu$ L
	T4 ligase (50 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
	10 $\times$ buffer	1 $\mu$ L

[0091] 16 $^{\circ}$ C连接过夜。

[0092] (4) 连接产物转化TOP10感受态细胞,PCR筛选重组克隆,挑选阳性克隆,使用细菌质粒提取试剂盒提取质粒进行双酶切验证(如图1所示),并测序检查基因序列的正确性。

[0093] (5) 将阳性克隆株按体积以1:100的接种量接种于LB(含50 $\mu$ g/mL卡纳霉素)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200rpm恒温摇床振荡培养至OD<sub>600</sub>为0.8~1.0,收集细菌,使用细菌质粒提取试剂盒提质粒pBE2R-lip。

[0094] (6) 将枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株在LB(含1 $\mu$ g/mL红霉素)平板上划线,37 $^{\circ}$ C培养箱内培养过夜。次日挑取单菌落于10mL LB培养液(含1 $\mu$ g/mL红霉素)中,在37 $^{\circ}$ C摇床200rpm振荡培养OD<sub>600</sub>1.0左右,添加终浓度为1% (w/v)的木糖,继续培养2h,制备成枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>菌株的感受态细胞,

[0095] (7) 将质粒pBE2R-lip转入枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub>感受态细胞,PCR筛选重组克隆,挑选阳性克隆(如图2所示),构建了枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip) 菌株。

[0096] (8) 利用SDS-PAGE试验进行检测目的蛋白的表达

[0097] 用发酵培养基培养菌株WB800 (pBE2R-lip),1:100接种,37 $^{\circ}$ C150r/min摇床培养,以转入pBE2R空质粒的枯草芽孢杆菌为对照,分别在24h、48h取样,分别取培养基中的分泌

蛋白和芽孢杆菌菌体中的上清样品15倍浓缩。通过SDS-PAGE分析,菌株WB800 (pBE2R-lip)和WB800 (pBE2R)在培养基中的分泌蛋白和菌体上清蛋白存在差异,WB800 (pBE2R-lip)菌株在32KDa的位置多出一个条带,根据分子量大小推算,可能是lip基因表达的蛋白(如图3所示)。

[0098] (9) 利用免疫印迹试验进行检测目的蛋白的表达

[0099] 将(8)制备的样品进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后,80V电压转膜45min,将蛋白转移至PVDF膜上,依次用PBST溶液轻轻漂洗3次后,用含5%脱脂奶粉的PBST室温封闭1h,加入一抗(兔抗lip蛋白抗体,1:1000倍稀释)室温孵育1h,洗膜3次后,加入二抗(带辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,1:5000倍稀释)室温孵育1h,用PBST室温下洗膜3次,最后显色,检查发现菌株WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip)的上清液样品和分泌液样品在32KDa位置有一条明显的条件,与(8)中SDS-PAGE胶中大小位置相似,菌株WB<sub>800</sub> (pBE2R)的上清液样品和分泌液样品无明显条带,因此,确定lip基因可能在枯草芽孢杆菌中存在表达,并可以分泌到胞外上清中(如图4所示)。

[0100] 二、疫苗的制备

[0101] (1) 将枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip)菌株活化后,按体积以1:100的接种量接种于含50μg/mL卡纳霉素的LB培养基,37℃、200rpm培养48h后,计算细菌的浓度,离心收集细菌。

[0102] (2) 将收集的枯草芽孢杆菌WB<sub>800</sub> (pBE2R-lip)用PBS调整浓度为 $3 \times 10^9$ CFU/mL。按质量比将1份菌液均匀喷洒在10份饲料表面,使饲料中枯草芽孢杆菌WB800 (pBE2R-lip)的含量为 $3 \times 10^8$ CFU/克。

[0103] (3) 将喷洒了菌液的饲料阴干后,即为口服疫苗。

[0104] 三、疫苗的保护效果评价

[0105] 枯草芽孢杆菌载体柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗的保护效果评估,其具体步骤是:180条健康的草鱼鱼种(体长3~5cm)于室内饲养14天后分为实验组和对照组,每组3个水族缸,每个水族缸30尾草鱼。试验组草鱼投喂口服疫苗7天后,改投普通饲料14天,再改投口服疫苗7天,然后投喂普通饲料;对照组一直投喂普通饲料。28℃饲养56天后,用柱状黄杆菌G4株做人工感染试验,统计人工感染后14d内实验组和对照组草鱼的累计死亡率(如图5所示),计算疫苗的免疫保护率。经计算,其免疫保护率可达52.4%。

[0106] 免疫保护率公式为: $[1 - (\text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率})] \times 100\%$ 。

[0107] 四、疫苗的使用

[0108] 当年的鱼苗养至5-7cm时,可进行免疫,采取口服投喂的方式进行免疫,按照草鱼体重2%的投喂量对草鱼进行投喂,连续免疫7天。在首次免疫间隔2周后进行加强免疫一次,免疫剂量与第一次相同。

[0109] 本发明中合成后的lip基因序列SEQ NO.1:

[0110] CTGCAGCTCACCATCATCACCATCATCATTGTAAGAAGAACGAGACGGGAGTTCTTGATTCTACTGAAACAGCTTCTGAAACTGATTCACAGGAATGTACAGTGAACAACACCATGTGCAGATTGCCCTGGTATCTATACAAATATTACCTTTAAGAAAAACGAAACGTGGCCAAATCAACACTGTACTTAGACAGTGATGATACATCACTCACAGATATATGGAGTATGGTCTAAAGAGAACAACATCATCGAAGTCACAATTCCTAACTACCGAAAGAGTATTATGCTATCAAACCGGATCACTTGTGGTGAGACTTAATGCTGATAAGAAAGAGGTTAGCGGAGAATTAAGCAAGAAATACATCT

TCGAGAAGACCGAAAGCTATACATCCAAAATGCTGAATGGCACGTACCAAACCTCAATTGACGGTAAAGGTTATAA  
TCAAATTCTGGAACCTCAAAGCAGACAATGACTCGATATATAATGTAAAAATTACGTTTACCGGCGCAACGAAAGGC  
TGCACGTTTGAAGGCAAAGGGCAATTAGTTAATAATCAGATAGACCTGGACCTTAACAAAATCAAAAAGAATCTTA  
AAGCGACCATGACGATTCAGTTTAAAGATGATACGAAAATTGCCGAAGTCTTTACCTCCAAATTTGATGAACGCTT  
TGATTTGATGCATTTCTGCGGGGGGGCGCGAGCTTAGCGGGCGATTATACTAAGAAACATCACCATCATCACCAT  
TCGCATGC。

[0111] 尽管为说明目的公开了本发明的实施例,但是本领域的技术人员可以理解:在不脱离本发明及所附权利要求的精神和范围内,各种替换、变化和修改都是可能的,因此,本发明的范围不局限于实施例和附图所公开的内容。

## 序列表

<110> 天津市水产研究所

<120> 一种柱状黄杆菌转基因工程口服疫苗、使用方法和应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 760

<212> DNA

<213> 合成后的lip基因序列 (Unknown)

<400> 1

```

ctgcagctca ccatcatcac catcatcatt gtaagaagaa cgagacggga gttcttgatt 60
ctactgaaac agcttctgaa actgatttca caggaatgta cagtggaaca acaccatgtg 120
cagattgccc tggatcttat acaaatatta ctttaagaa aaacggaaac gtggccaaat 180
caacactgta cttagacagt gatgatacat cactcacaga atatggagta tggcttaaag 240
agaacaacat catcgaagtc acaattccta actcaccgaa agagtattat gctatcaaac 300
cggatcactt gttggtgaga cttaatgctg ataagaaaga ggttagcggga gaattaagca 360
agaaatacat cttcgagaag accgaaagct atacatccaa aatgctgaat ggcacgtacc 420
aaacttcaat tgacggtaaa ggttataatc aaattctgga actcaaagca gacaatgact 480
cgatatataa tgtaaaaatt acgtttaccg gcgcaacgaa aggctgcacg tttgaaggca 540
aagggcaatt agttaataat cagatagacc tggaccttaa caaatcaaa aagaatctta 600
aagcgaccat gacgattcag tttaaagatg atacgaaaat tgccgaagtc tttacctcca 660
aatttgatga acgctttgat ttgatgcatt tctgcggggg gggcgcgagc ttagcgggcg 720
attatactaa gaaacatcac catcatcacc attcgcattgc 760

```

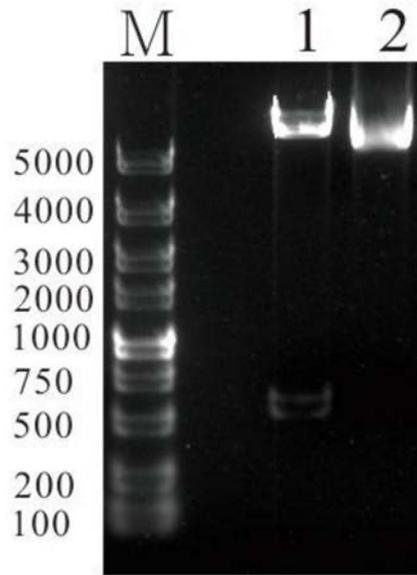


图1

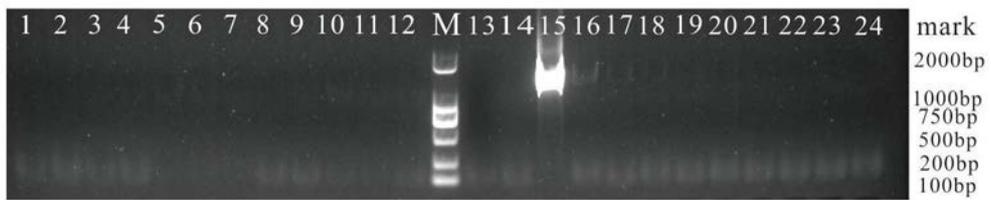


图2

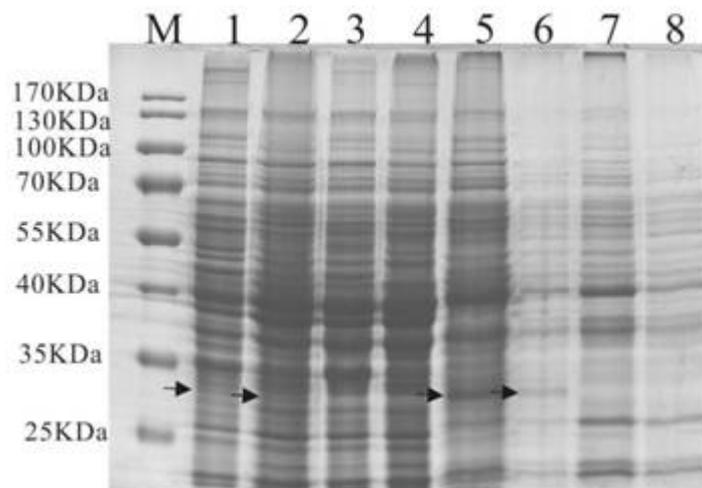


图3

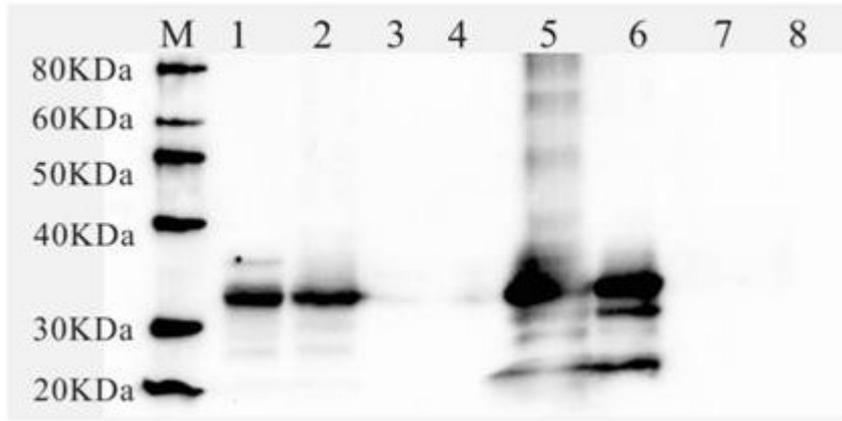


图4

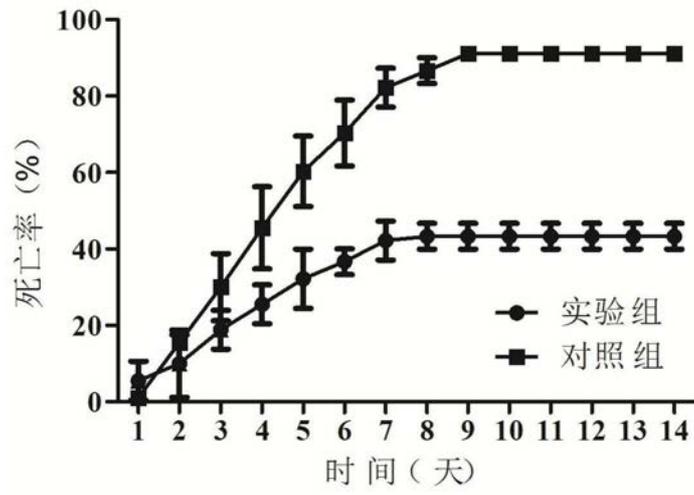


图5