

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102580074 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201110002469. 5

C07K 14/245(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 01. 07

A61K 39/02(2006. 01)

A61K 39/108(2006. 01)

(71) 申请人 北京大北农科技集团股份有限公司

地址 100080 北京市海淀区中关村大街 27 号中关村大厦 14 层大北农集团

申请人 福建省农科院畜牧兽医研究所
福州大北农生物技术有限公司

(72) 发明人 杜金玲 牟巍 赵亚荣 黄瑜
程龙飞 郭书豪 傅光华 卢会英
王勇鹤 施少华 陈红梅

(51) Int. Cl.

A61K 39/116(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

C12N 15/31(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

C07K 14/195(2006. 01)

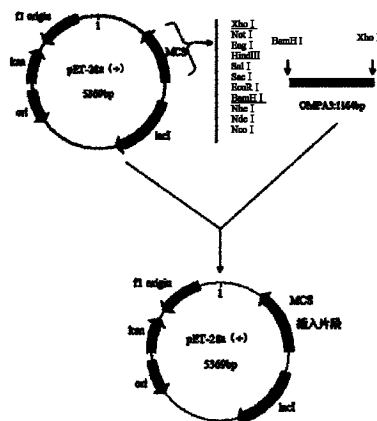
权利要求书 2 页 说明书 14 页
序列表 2 页 附图 3 页

(54) 发明名称

鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于兽医生物技术领域,具体涉及鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗及其制备方法。本发明的鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗是抗原与油佐剂以体积比 1 : 1 ~ 1 : 5 的比例乳化配制而成,抗原为鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白和 / 或鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白,动物试验表明,采用本方法制备的疫苗免疫动物后,疫苗的安全性好,免疫效果明显,动物体内能产生高效价的抗体,可以抵御同型鸭疫里氏杆菌和多种血清型大肠杆菌的攻击。



1. 一种鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗,包括抗原和油佐剂,其特征在于抗原与油佐剂以体积比 1 : 1 ~ 1 : 5 的比例乳化配制而成,抗原为鸭疫里氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*) RA1 型外膜蛋白和 / 或鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ (*Avian pathogenic Escherichia coli* APEC O₇₈) 外膜蛋白。

2. 权 1 所述的鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗,其特征在于鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白和 / 或鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白的体积比为 :1 : 1 : 1 或 1 : 1。

3. 权 1 所述的鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗,其特征在于油佐剂由 94% 的白油 (v/v)、6% 的司本 -80 (v/v) 和 2% 的硬脂酸铝 (g/v) 组成。

4. 如权 1-3 任一项所述的鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗的制备方法,其特征在于步骤如下:

(1) 外膜蛋白基因的扩增及克隆

根据鸭疫里氏杆菌外膜蛋白 OMPA 基因、大肠杆菌外膜蛋白 OMPA 基因序列设计引物,PCR 扩增鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白 OMPA1 基因、RA2 型外膜蛋白 OMPA2 基因和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 OMPA3 基因片段,将 OMPA1、OMP A2 及 OMPA3 分别克隆到载体 pMD-18-T 上,得到质粒 pMD-18-T-OMP A1、pMD-18-T-OMP A2 和 pMD-18-T-OMP A3,进行测序;

(2) 重组质粒的构建

阳性质粒 pMD-18-T-OMP A1、pMD-18-T-OMP A2 和 pMD-18-T-OMP A3 以限制性内切酶双酶切后,将三个外膜蛋白基因分别克隆到质粒载体 pET-28a(+) 上,得到重组阳性质粒 pET-28a(+)-OMP A1、pET-28a(+)-OMP A2 和 pET-28a(+)-OMP A3;

(3) 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

重组质粒 pET-28a(+)-OMP A1、pET-28a(+)-OMP A2 和 pET-28a(+)-OMP A3 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3),然后抗性筛选阳性表达菌株,通过诱导的方法诱导目的蛋白表达;

(4) 表达蛋白的纯化

表达后的鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白 OMPA1、鸭疫里氏杆菌 RA2 外膜蛋白 OMPA2、禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 OMPA3 通过 Ni-NTA His. BindResin 纯化柱纯化目的蛋白,然后大量表达得到足量的外膜蛋白保存于 -20℃ 备用;

(5) 以纯化后的外膜蛋白溶液为原料,制备疫苗

将纯化后的鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白 OMPA1 和 / 或鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白 OMPA2 和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 OMPA3 溶液调整到适当的浓度,按比例混合,加入油佐剂乳化后分装即可。

5. 权 4 所述的鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗的制备方法,其特征在于鸭疫里氏杆菌 RA1 型、RA2 型外膜蛋白 OMPA 基因引物序列如下:

RA-OMP A-F :GCTGGATCCATGGGTAAGAATTTATG

RA-OMP A-R :AGTCTCGAGTCTTACAAGAAGAGGACGCTT

禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 OMPA 基因引物序列如下:

E-OMP A-F :ATGGATCCGCTCCGAAAAGATAAC

E-OMP A-R :ATACTCGAGTTAAGCCTGCGGCTGAGT.

6. 鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗在制备防治鸭疫里氏杆菌、禽大肠杆菌

病的制剂中的应用。

鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗及其制备方法,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 鸭疫里氏杆菌 (RA) 病,又称鸭传染性浆膜炎,是目前对养鸭业危害最严重的传染病之一,多见于 1-8 周龄雏鸭,尤以 2-3 周龄雏鸭最易感,死亡率一般在 5% -75%之间,环境恶劣或混合感染其他疫病时死亡率可达 90%以上,RA 血清型复杂,而且各血清型间缺乏交叉保护作用,据目前调查,RA1 型和 RA2 型占分离菌株的 74%以上,为我国当前主要流行的血清型。鉴于常规的药物易产生耐药性,对 RA 的控制效果并不理想以及不同的血清型菌株之间基本没有交叉免疫保护作用,因此研制针对主要流行血清型菌株的疫苗以控制本病是当前研究的热点。鸭疫里氏杆菌的外膜蛋白 OMPs (Outer Membrane Proteins, OMPs) 能诱导特异性的体液和细胞毒性反应,而且还能辅助其他抗原内化和交叉提呈,具有潜在的免疫载体功能,可以提高机体的免疫应答,具有较强的免疫保护作用,是一种潜在的共同保护性抗原。

[0003] 禽大肠杆菌病是由禽致病性大肠杆菌引起的各种日龄鸭的急性败血性细菌病,以心包炎、气囊炎、肝周炎、腹膜炎为主要特征,在鸭群中大肠杆菌与鸭疫里氏杆菌病并发,大肠杆菌血清亚型众多,主要的血清型有 O₇₈、O₁、O₂ 等,其中尤以 O₇₈ 更为常见。疫苗的免疫预防是目前控制大肠杆菌病的重要手段,但是目前常用的单价血清型灭活苗仅对同型致病性菌株有抵抗力,多价灭活苗为不同血清型的代表株相加而成,但在抗原含量与保护力上难以两全。大肠杆菌外膜蛋白不但与大肠杆菌的致病机理相关,而且具有良好的免疫原性,可加快巨噬细胞对抗原的提呈作用,激活淋巴细胞的增殖反应,刺激机体产生体液免疫和细胞免疫,而且更为重要的是不同血清型菌株间具有交叉保护作用,能抵抗同源和异源菌株的攻击。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种鸭疫里氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) RA1、RA2 型外膜蛋白和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ (*Avian pathogenic Escherichia coli* APECO₇₈) 外膜蛋白组合制成的二联疫苗,动物实验表明,本发明的二联疫苗的免疫安全性好,免疫效果明显,在动物体内可产生高效价的抗体,能够有效抵御同型鸭疫里氏杆菌和多种血清型大肠杆菌的攻击,可作为预防鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌的疫苗。

[0005] 本发明的另一目的是提供该二联疫苗的制备方法。

[0006] 本发明的目的是通过如下技术方案实现的:

[0007] 本发明提供一种鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗,它包括抗原和油佐剂,其特征在于抗原与油佐剂以体积比 1 : 1 ~ 1 : 5 的比例乳化配制而成,抗原为鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白和 / 或鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜

蛋白。

[0008] 本发明的二联疫苗,鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白和 / 或鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白和大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白的体积比为 :1 : 1 : 1 或 1 : 1,即抗原为鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白 : 禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 = 1 : 1,抗原为鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白 : 禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 = 1 : 1,抗原为鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白 : 鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白 : 禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 = 1 : 1 : 1。

[0009] 其中,本发明的油佐剂由 94% 的白油 (v/v)、6% 的司本 -80 (v/v) 和 2% 的硬脂酸铝 (g/v) 组成。

[0010] 本发明还提供了该鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗的制备方法,其特征在于步骤如下:

[0011] (1) 外膜蛋白基因的扩增及克隆

[0012] 根据鸭疫里氏杆菌外膜蛋白 OMPA 基因、大肠杆菌外膜蛋白 OMPA 基因序列设计引物,PCR 扩增鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白 OMPA1 基因、RA2 型外膜蛋白 OMPA2 基因和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 OMPA3 基因片段,将 OMPA1、OMP A2 及 OMPA3 分别克隆到载体 pMD-18-T 上,得到质粒 pMD-18-T-OMP A1、pMD-18-T-OMP A2 和 pMD-18-T-OMP A3,进行测序;

[0013] (2) 重组质粒的构建

[0014] 阳性质粒 pMD-18-T-OMP A1、pMD-18-T-OMP A2 和 pMD-18-T-OMP A3 以限制性内切酶双酶切后,将三个外膜蛋白基因分别克隆到质粒载体 pET-28a(+) 上,得到重组阳性质粒 pET-28a(+)-OMP A1、pET-28a(+)-OMP A2 和 pET-28a(+)-OMP A3;

[0015] (3) 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

[0016] 重组质粒 pET-28a(+)-OMP A1、pET-28a(+)-OMP A2 和 pET-28a(+)-OMP A3 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3),然后抗性筛选阳性表达菌株,通过诱导的方法诱导目的蛋白表达;

[0017] (4) 表达蛋白的纯化

[0018] 表达后的鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白 OMPA1、鸭疫里氏杆菌 RA2 外膜蛋白 OMPA2、禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 OMPA3 通过 Ni-NTA His. BindResin 纯化柱纯化目的蛋白,然后大量表达得到足量的外膜蛋白保存于 -20℃ 备用;

[0019] (5) 以纯化后的外膜蛋白溶液为原料,制备疫苗

[0020] 将纯化后的鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白 OMPA1 和 / 或鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白 OMPA2 和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 OMPA3 溶液调整到适当的浓度,各疫苗中外膜蛋白的体积比均相同,含量均为 30 ~ 50 μ g/mL,按比例混合,加入油佐剂乳化后分装即可。

[0021] 其中,PCR 扩增中用的特异性引物,是根据 Genbank 中鸭疫里氏杆菌 ATCC11845 株 (登录号 AF104937) 和大肠杆菌 K12W3110 株 (登录号 AP009048) 的 OMPA 基因序列设计,上游引物引入 BamH I 酶切位点,下游引物引入 Xho I 酶切位点;鸭疫里氏杆菌 RA1 型、RA2 型外膜蛋白 OMPA 基因引物序列如下:

[0022] RA-OMP A-F :GCTGGATCCATGGGTAAAGAATTTATG

[0023] RA-OMP A-R :AGTCTCGAGTCTTACAAGAAGAGGACGCTT

[0024] 禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 OMPA 基因引物序列如下:

[0025] E-OMP A-F :ATGGATCCGCTCCGAAAAGATAAC

[0026] E-OMP A-R :ATACTCGAGTTAAGCCTGCGGCTGAGT。

[0027] 本发明的鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗可以用于制备防治鸭疫里氏杆菌、禽大肠杆菌病的制剂。

[0028] 本发明 PCR 扩增的模板分别为鸭疫里氏杆菌 RA1 型、RA2 型、禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 的基因组,鸭疫里氏杆菌 RA1 型、RA2 型、禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 可为当前国内公开的任何相应毒株,不影响本发明的实施,且其基因序列已在 Genbank 中公开,本发明的鸭疫里氏杆菌 RA1 型、RA2 型菌株来源于福建省农科院畜牧兽医研究所,禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 来源于中国兽医药品监察所;扩增得到的三个外膜蛋白基因片段 OMPA1、OMPA2 及 OMPA3 大小分别为 1164bp、1164bp、975bp;表达所得的外膜蛋白 OMPA1、OMPA2 及 OMPA3 大小分别为 42KD、42KD、37KD。

[0029] 其中,本发明油佐剂可按如下方法配制:配油相时先取少量注射用白油与硬脂酸铝混合,加热溶化,再与全量司本-80 及剩余的注射用白油混合均匀,116℃灭菌 30 分钟,冷至室温即得本发明的油佐剂。

[0030] 本发明的鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗及其制备方法的有益效果:

[0031] 1) 生物安全性高,本发明疫苗的抗原成分均为外膜蛋白,所以接种动物后不存在疫苗散毒的潜在危险;

[0032] 2) 本发明疫苗一苗多防,且防御效果好,本发明是利用鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白高度保守性和强的免疫原性,首次将鸭疫里氏杆菌 RA1、RA2 型外膜蛋白和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白进行不同组合制备而成的二联疫苗,而且不同血清型的大肠杆菌外膜蛋白具有广泛的交叉保护作用,所以本疫苗可以同时防治同型鸭疫里氏杆菌和多血清型的大肠杆菌;

[0033] 3) 本发明生产成本低,本发明所提供的三种外膜蛋白抗原是通过原核表达的方法制备的,而且带有标签,方便纯化,适合大规模的生产。

附图说明

[0034] 图 1 扩增的鸭疫里氏杆菌 RA1 型外膜蛋白 OMPA1 片段电泳图

[0035] 图 2 扩增的鸭疫里氏杆菌 RA2 型外膜蛋白 OMPA2 片段电泳图

[0036] 图 3 扩增的禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白 OMPA3 片段电泳图

[0037] 图 4 原核表达质粒 pET-28a(+)-OMPA1 构建图谱

[0038] 图 5 原核表达质粒 pET-28a(+)-OMPA2 构建图谱

[0039] 图 6 原核表达质粒 pET-28a(+)-OMPA3 构建图谱

具体实施方式

[0040] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0041] 实施例 1 鸭疫里氏杆菌 RA1、RA2 型外膜蛋白原核表达菌株的构建

[0042] (1) 引物的设计

[0043] 根据 Genbank 中鸭疫里氏杆菌 ATCC11845 株(登录号 AF104937)的 OMPA 基因序列设计特异性引物,上游引物引入 BamH I 酶切位点,下游引物引入 Xho I 酶切位点。

[0044] 其引物序列如下:

[0045] RA-OMPA-F :GCTGGATCCATGGGTAAAGAATTTATG

[0046] RA-OMPA-R :AGTCTCGAGTCTTACAAGAAGAGGACGCTT

[0047] (2) 基因组的提取

[0048] A、将鸭疫里氏杆菌 RA1 型、RA2 型菌株菌种划线接种于含 2% 新生牛血清的胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 平板上,于 37℃ 温箱中培养 24h ;

[0049] B、挑取单菌落接种于马丁肉汤液体培养基,37℃ 摇床振荡培养过夜 ;

[0050] C、将菌液转移至 1.5mL eppendorf 管中,8000r/min 转离心 2min,弃上清,加入 500 μ L TE buffer (pH 8.0) 重悬复溶 ;

[0051] D、加入 30 μ L 10% SDS、3 μ L 蛋白酶 K (20mg/mL),55℃ 水浴过夜 ;

[0052] E、加入 200 μ L 3M 氯化钠,65℃ 水浴 10min ;

[0053] F、以等体积的酚氯仿抽提,12000r/min 离心 5min 取上清 ;

[0054] G、重复步骤 F ;

[0055] H、加入 10% 体积的 3M 醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇,轻轻混匀,冰上放置 30min ;

[0056] I、用枪头将絮状沉淀勾出,并以 70% 乙醇洗涤一次 ;

[0057] J、加入 30 ~ 50 μ L 的 TE Rnase 溶解。

[0058] (3) 外膜蛋白的克隆

[0059] 分别以鸭疫里氏杆菌 RA1 型、RA2 型基因组为模板扩增鸭疫里氏杆菌的外膜蛋白,在 PCR 反应管中加入 5 μ L 10×PCR Buffer,4 μ L 2.5mmol dNTP,上下游引物各 2 μ L,模板 DNA 5 μ L,去离子水 50 μ L,PCR 反应条件 :95℃ 10min 后,95℃ 40s,50℃ 40s,72℃ 2min,30 个循环后,再 72℃ 延伸 10min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物,并将 PCR 产物用胶回收试剂盒回收得鸭疫里氏杆菌外膜蛋白 OMPA1 和 OMPA2。

[0060] (4) 克隆质粒 pMD18T-OMPA1、pMD18T-OMPA2 的构建

[0061] 通过 TA 连接的方法分别将片段 OMPA1、OMPA2 连接到 pMD18T 克隆载体上。具体的步骤 :先将回收产物加 A 反应体系 :回收 PCR 产物 30 μ L, dATP1 μ L,10×buffer3.5 μ L, TaqDNA 聚合酶 0.5 μ L。将所有的物质混匀后放于 PCR 反应仪中 72℃ 作用 15min。然后进行凝胶电泳,对产物进行回收。然后连接构建 T 载体克隆质粒,反应体系为 :加 A 后回收的产物 4.5 μ L, pMD-18T 载体 0.5 μ L, Solution I 5 μ L, Total 10 μ L。轻轻混匀后,于 16℃ 连接过夜。转化 DH5 α 感受态细胞,通过抗性筛选得到阳性质粒即为所构建成功的克隆质粒 pMD18T-OMPA1、pMD18T-OMPA2,进行测序。

[0062] (5) 表达质粒的构建

[0063] 原核表达载体 pET-28a(+) 以 BamH I、Xho I 双酶切,测序鉴定正确的 pMD18T-OMPA1、pMD18T-OMPA2 分别以 BamH I、Xho I 进行双酶切,酶切后将目的片段 OMPA1、OMPA2 同载体进行连接,反应体系如下 :酶切后的载体 pET-28a(+) 1 μ L,酶切后的目的片段 2 μ L,10×buffer 1 μ L, T4 连接酶 0.5 μ L,去离子水 5.5 μ L,于 16℃ 连接过夜。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,通过卡那霉素抗性筛选得到阳性质粒。

[0064] (6) 原核表达菌株的构建

[0065] 筛选到的重组阳性质粒 pET-28a(+)-OMPA1、pET-28a(+)-OMPA2 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3),通过抗性筛选阳性表达菌株。

[0066] 实施例 2 禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白原核表达菌株的构建

[0067] (1) 引物的设计

[0068] 根据 Genbank 中大肠杆菌 K12W3110 株 (登录号 AP009048) 的 OMPA 基因序列设计特异性引物,上游引物引入 BamH I 酶切位点,下游引物引入 XhoI 酶切位点。

[0069] 其引物序列如下:

[0070] E-OMPA-F :ATGGATCCGCTCCGAAAGATAAC

[0071] E-OMPA-R :ATACTCGAGTTAAGCCTGCGGCTGAGT

[0072] (2) 基因组的提取

[0073] A、将禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 菌株菌种划线接种于 MB 琼脂平板上,37℃培养 36h;

[0074] B、挑取单菌落接种于 MB 液体培养基,37℃摇床振荡培养过夜;

[0075] C、将菌液转移至 1.5mL eppendorf 管中,8000r/min 转离心 2min,弃上清,加入 500 μL TE buffer (pH 8.0) 重悬复溶;

[0076] D、加入 30 μL 10% SDS、3 μL 蛋白酶 K (20mg/mL),55℃水浴过夜;

[0077] E、加入 200 μL 3M 氯化钠,65℃水浴 10min;

[0078] F、以等体积的酚氯仿抽提,12000r/min 离心 5min 取上清;

[0079] G、重复步骤 F;

[0080] H、加入 10% 体积的 3M 醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇,轻轻混匀,冰上放置 30min;

[0081] I、用枪头将絮状沉淀勾出,并以 70% 乙醇洗涤一次;

[0082] J、加入 30 ~ 50 μL 的 TE Rnase 溶解。

[0083] (3) 外膜蛋白的克隆

[0084] 以禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 的基因组为模板扩增大肠杆菌的外膜蛋白,在 PCR 反应管中加入 5 μL 10×PCR Buffer,4 μL 2.5mmol dNTP,上下游引物各 2 μL,模板 DNA 5 μL,去离子水 50 μL,PCR 反应条件:95℃ 5min 后,94℃ 40s,58℃ 40s,72℃ 2min,30 个循环后,再 72℃ 延伸 10min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物,并将 PCR 产物用胶回收试剂盒回收大肠杆菌外膜蛋白 OMPA3。

[0085] (4) 克隆质粒 pMD18T-OMPA3 的构建

[0086] 通过 TA 连接的方法将克隆片段 OMPA3 连接到 pMD18T 克隆载体上。具体的步骤:先进行回收产物加 A 反应体系:回收 PCR 产物 30 μL, dATP 1 μL, 10×buffer 3.5 μL, TaqDNA 聚合酶 0.5 μL。将所有的物质混匀后放于 PCR 反应仪中 72℃ 作用 15min。然后进行凝胶电泳,对产物进行回收。然后连接构建 T 载体克隆质粒,反应体系为:加 A 后回收的产物 4.5 μL, pMD-18T 载体 0.5 μL, Solution I 5 μL, Total 10 μL。轻轻混匀后,于 16℃ 连接过夜。转化 DH5 α 感受态细胞,通过抗性筛选得到阳性质粒即为所构建成功的克隆质粒 pMD18T-OMPA3,进行测序。

[0087] (5) 表达质粒的构建

[0088] 原核表达载体 pET-28a(+) 以 BamH I、Xho I 双酶切,测序鉴定正确的 pMD18T-OMPA3 以 BamH I、Xho I 进行双酶切,酶切后将目的片段 OMPA3 同载体进行连接,反应体系如下:酶切后的载体 pET-28a(+) 1 μL,酶切后的目的片段 OMPA3 2 μL, 10×buffer 1 μL, T4 连接酶 0.5 μL,去离子水 5.5 μL,于 16℃ 连接过夜。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,通过卡那霉素抗性筛选得到阳性质粒。

[0089] (6) 原核表达菌株的构建

[0090] 筛选到的重组阳性质粒 pET-28a(+)-OMPA3 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 通过抗性筛选阳性表达菌株。

[0091] 实施例 3 鸭疫里氏杆菌 RA1、RA2 外膜蛋白原核表达菌株的诱导表达及大量生产

[0092] (1) 筛选出的鸭疫里氏杆菌 RA1、RA2 外膜蛋白原核表达阳性菌诱导表达

[0093] 将保存的菌液按体积比为 1 : 1000 的比例接种加有 Kan 抗性的 5mL LB 培养基中, 每个菌接种两管, 一管用于诱导, 另一管用于非诱导对照, 同时要接种一管空质粒菌作为对照。37℃ 过夜培养至 OD_{600nm} 值约为 0.4 时, 诱导管和空质粒对照管加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 非诱导对照不加, 于 37℃ 培养 4h 后每隔半小时从每管取出 1mL 菌液于 1.5mL eppendorf 管中, 标记好, 12000rpm 离心, 弃去上清得到沉淀, 然后每管中加入 100 μ L 的 PBS 洗涤一次, 最后加入 300 μ L PBS 和 100 μ L 4 \times 蛋白上样 buffer, 充分混匀, 冰上作用 15min, 100℃ 煮沸 3min 后于 12000rpm 离心 10min, 取离心后的上清液进行 SDS-PAGE, 检测每个菌的诱导能力。比较表达的目的蛋白的大小及表达的蛋白条带的宽度来判断每个菌的表达能力。每个蛋白挑选表达能力高的两个菌, 用于大量的蛋白表达。

[0094] (2) 表达产物的鉴定

[0095] 按照常规的 SDS-Page 方法对表达产物进行鉴定。

[0096] (3) 表达产物的纯化

[0097] 用 Ni-NTA His. Bind Resin 纯化柱纯化蛋白。方法: 将 1mL 50% 的 Ni-NTA His. Bind Resin 填充材料于 4mL 1 \times Ni-NTA Bind Buffer 轻轻混匀。在重力作用下使树脂堆积, 然后用枪头除去 4mL 的上清液。然后加入 4mL 的溶解物 (表达的上清液) 与填料混匀, 在 4℃ 摇床上混匀作用 1h。然后将填料加到层析柱中, 填料沉积下来后, 打开柱子底下的帽, 打开蛋白纯化仪进行纯化, 收集流出的液体, 留作 SDS-PAGE。然后用 2 \times 4mL 1 \times Ni-NTA wash buffer 洗柱子, 收集洗出的液体, 留作 SDS-PAGE, 接着用 4 \times 0.5mL 1 \times Ni-NTA Elution Buffer 洗脱下来蛋白, 收集洗脱液, 留作 SDS-PAGE。

[0098] (4) 表达产物的大量表达及表达产物的浓度的定量

[0099] 根据上述步骤大量诱导表达目的蛋白, 同样对表达产物进行纯化, 经测定蛋白浓度分别为 420mg/L、386mg/L。

[0100] 实施例 4 禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白原核表达菌株的诱导表达及大量生产

[0101] (1) 筛选出的禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白原核表达阳性菌进行诱导筛选

[0102] 将保存的菌液按体积比为 1 : 1000 的比例接种加有 Kan 抗性的 5mL LB 培养基中, 每个菌接种两管, 一管用于诱导, 另一管用于非诱导对照, 同时要接种一管空质粒菌作为对照。37℃ 过夜培养至 OD_{600nm} 值约为 0.5 时, 诱导管和空质粒对照管加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 非诱导对照不加, 于 37℃ 培养 4h 后每隔半小时从每管取出 1mL 菌液于 1.5mL eppendorf 管中, 标记好, 12000rpm 离心, 弃去上清得到沉淀, 然后每管中加入 100 μ L 的 PBS 洗涤一次, 最后加入 300 μ L PBS 和 100 μ L 4 \times 蛋白上样 buffer, 充分混匀, 冰上作用 15min, 100℃ 煮沸 5min 后于 12000rpm 离心 10min, 取离心后的上清液进行 SDS-PAGE, 检测每个菌的诱导能力。比较表达的目的蛋白的大小及表达的蛋白条带的宽度来判断每个菌的表达能力。每个蛋白挑选表达能力高的两个菌, 用于大量的蛋白的表达。

[0103] (2) 表达产物的鉴定

[0104] 按照常规的 SDS-Page 方法对表达产物进行鉴定。

[0105] (3) 表达产物的纯化

[0106] 用Ni-NTA His. Bind Resin纯化柱纯化蛋白。方法：将1mL50%的Ni-NTA His. Bind Resin填充材料于4mL1×Ni-NTA Bind Buffer轻轻混匀。在重力作用下使树脂堆积，然后用枪头除去4mL的上清液。然后加入4mL的溶解物（表达的上清液）与填料混匀，在4℃摇床上混匀作用1h。然后将填料加到层析柱中，填料沉积下来后，打开柱子底下的帽，打开蛋白纯化仪进行纯化，收集流出的液体，留作SDS-PAGE。然后用2×4mL1×Ni-NTA wash buffer洗柱子，收集洗出的液体，留作SDS-PAGE，接着用4×0.5mL1×Ni-NTA Elution Buffer洗脱下来蛋白，收集洗脱液，留作SDS-PAGE。

[0107] (4) 表达产物的大量表达及表达产物的浓度定量

[0108] 根据上述步骤大量诱导表达目的蛋白，同样对表达产物进行纯化，经测定蛋白浓度为440mg/L。

[0109] 实施例5 鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗的制备

[0110] 取上述实施例中纯化后稀释至30 μg/mL的相同浓度的鸭疫里氏杆菌RA1、RA2外膜蛋白OMPA1、OMPA2和禽致病性大肠杆菌O₇₈外膜蛋白OMPA3以相同的体积比进行以下三种组合：OMPA1+OMPA3、OMPA2+OMPA3、OMPA1+OMPA2+OMPA3，混合均匀，然后再以抗原：油佐剂为1：1的比例加入油佐剂，乳化得到疫苗。

[0111] 制备的疫苗物理性状检验、安全检验、效力检验等均合格。

[0112] 所制备疫苗的质量标准：

[0113] ①性状

[0114] 外观 乳白色乳剂。

[0115] 剂型 为油包水型。取一个清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水中，除第1滴外，均应不扩散。

[0116] 稳定性 取疫苗10mL加入离心管中，以3000rpm离心15min，应不分层，管底析出的水相应不大于0.5mL。

[0117] 粘度 用1mL吸管（下口的内径1.2mm，上口内径2.7mm）吸取25℃左右的疫苗1mL，令其垂直自然流出，记录流出0.4mL所需的时间，应在8秒以内。

[0118] ②无菌检验 按《中国兽药典》进行，应无菌生长。

[0119] ③安全检验 选取5-10日龄雏鸭70羽，随机分四组，按表1进行试验。

[0120] 表1 疫苗安全性检验

实验组	动物数量 (羽)	接种组别	接种羽数	接种途径	接种剂量 (mL)	接种次数
[0121] 免疫组一 OMPA1+OMPA3	20	一次超剂量	10	颈部背侧皮下	1	1
		单剂量重复	10	颈部背侧皮下	0.5	2
免疫组二 OMPA2+OMPA3	20	一次超剂量	10	颈部背侧皮下	1	1
		单剂量重复	10	颈部背侧皮下	0.5	2
[0122] 免疫组三 OMPA1+OMPA2 +OMPA3	20	一次超剂量	10	颈部背侧皮下	1	1
		单剂量重复	10	颈部背侧皮下	0.5	2
对照组	10	/	/	/	/	/

[0123] 疫苗接种后各免疫组和对照组同样条件下饲养,每次接种后观察 14 日,结果注射疫苗的免疫组和对照组无差别,均未出现由疫苗引起的任何局部和全身不良反应,说明疫苗的安全性好。

[0124] ④效力检验

[0125] 采用免疫攻毒法,取 5~10 日龄健康易感雏鸭(鸭疫里氏杆菌 RA1、RA2 型和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ELISA 抗体检测均呈阴性)140 羽,随机分为 3 组,按表 2 进行疫苗的效力检验试验,其中免疫组疫苗接种均采用颈部背侧皮下注射的方法,对照组不注射任何试剂,同等条件饲养。免疫后 14 日,进行攻毒,均采用腿部肌肉注射的方式,攻毒后均观察 10 日。试验结果显示鸭疫里氏杆菌 RA1、RA2 型外膜蛋白和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 外膜蛋白组合制备的三种二联疫苗免疫试验鸭后 14 日对同型鸭疫里氏杆菌 1×10^8 CFU 和禽致病性大肠杆菌 O₇₈ 5×10^7 CFU 的攻击均产生了 100% 的保护,对照组 100% 发病,死亡率均达 80%。具体见表 2。

[0126] 表 2 疫苗效力性实验

[0127]

实验组	动物数量 (羽)	免疫疫苗剂量 (mL)	攻菌种类	接种羽数	攻击剂量 (CFU/只)	发病数	死亡数	保护率 (%)
免疫组一 OMPA1+OMPA3	20	0.5	RA1	10	1×10^8	0	0	100
			O ₇₈	10	5×10^7	0	0	100
对照组一	20	/	RA1	10	1×10^8	10	10	0
			O ₇₈	10	5×10^7	10	10	0
免疫组二 OMPA2+OMPA3	20	0.5	RA2	10	1×10^8	0	0	100
			O ₇₈	10	5×10^7	0	0	100
对照组二	20	/	RA2	10	1×10^8	10	8	0
			O ₇₈	10	5×10^7	10	10	0
免疫组三 OMPA1+OMPA2 +OMPA3	30	0.5	RA1	10	1×10^8	0	0	100
			RA2	10	1×10^8	0	0	100
			O ₇₈	10	5×10^7	0	0	100
对照组三	30	/	RA1	10	1×10^8	10	9	0
			RA2	10	1×10^8	10	10	0
			O ₇₈	10	5×10^7	10	10	0

[0128]

[0129] 实施例 6 鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗的动物免疫及攻毒保护实验

[0130] 5 日龄健康雏鸭 990 羽随机分组, 免疫组一 330 羽, 其中 180 羽雏鸭颈部背侧皮下免疫 OMPA1+OMPA3 疫苗 0.5ml, 另 150 羽为不注射的对照组; 免疫组二 330 羽, 其中 180 羽雏鸭颈部背侧皮下免疫 OMPA2+OMPA3 疫苗 0.5ml, 另 150 羽为不注射的对照组; 免疫组三 330 羽, 其中 180 羽雏鸭颈部背侧皮下免疫 OMPA1+OMPA2+OMPA3 疫苗 0.5ml, 另 150 羽为不注射的对照组。同条件下饲养。雏鸭免疫后 14、28、60 日分别随机抽取各免疫组 10 羽采血分离血清进行 ELISA 抗体检测, 结果见表 3; 同时进行攻菌试验, 于免疫后 14、28、60 日从各免疫组和对照组分别随机抽取试验鸭 10 羽攻击剂量为 1×10^8 CFU/ 只的 RA1、RA2 型鸭疫里氏杆菌和剂量为 5×10^7 CFU/ 只的 O₁、O₂、O₇₈ 型禽致病性大肠杆菌, 结果各免疫组在 14 和 28 日时对同型鸭疫里氏杆菌和 O₁、O₂、O₇₈ 三种血清型禽致病性大肠杆菌的攻击均能达 100% 的保护, 至免疫后 60 天, 各免疫组试验鸭对同型鸭疫里氏杆菌攻击保护率仍在 90% 以上, 而对 O₁、O₂、O₇₈ 三种血清型禽致病性大肠杆菌的保护率仍在 70% 以上, 具体见表 4。

[0131] 表 3 本发明疫苗免疫后鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌抗体检测结果

[0132]	免疫后 时间 (d)	实验组	RA1 ELISA 抗体滴度 平均值	RA2 ELISA 抗体滴度 平均值	O ₇₈ ELISA 抗体滴度 平均值
14		免疫组一	1250	1200	1020
		对照组一	0	0	0
		免疫组二	1200	1200	960
		对照组	0	0	0
		免疫组三	1180	1280	1080
		对照组	0	0	0
[0133] 28		免疫组一	1100	1180	970
		对照组	0	0	0
		免疫组二	1060	1200	930
		对照组	0	0	0
		免疫组三	1020	1120	910
		对照组	0	0	0
60		免疫组一	800	760	640
		对照组	0	0	0
		免疫组二	770	790	700
		对照组	0	0	0
		免疫组三	790	730	710
		对照组	0	0	0

[0134] 表 4 攻菌实验中鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗的保护情况

免疫后 时间 (d)	实验组	攻菌种 类	攻击 雏鸭数 量	攻菌剂量 (CFU/只)	发病 数	死亡 数	保护率 (%)
[0135]	免疫组一 OMPA1+OMPA3	RA1	10	1×10^8	0	0	100
		RA2	10	1×10^8	7	7	30
		O₇₈	10	5×10^7	0	0	100
		O₁	10	5×10^7	0	0	100
		O₂	10	5×10^7	0	0	100
	对照组一	RA1	10	1×10^8	10	10	0

		RA2	10	1×10^8	10	9	0
		O ₇₈	10	5×10^7	10	9	0
		O ₁	10	5×10^7	10	8	0
		O ₂	10	5×10^7	10	10	0
		RA1	10	1×10^8	7	6	30
	免疫组二	RA2	10	1×10^8	0	0	100
	OMPA2+OMPA3	O ₇₈	10	5×10^7	0	0	100
		O ₁	10	5×10^7	0	0	100
		O ₂	10	5×10^7	0	0	100
		RA1	10	1×10^8	10	10	0
	对照组二	RA2	10	1×10^8	10	9	0
	OMPA2+OMPA3	O ₇₈	10	5×10^7	10	10	0
		O ₁	10	5×10^7	10	8	0
		O ₂	10	5×10^7	10	10	0
		RA1	10	1×10^8	0	0	100
	免疫组三	RA2	10	1×10^8	0	0	100
	OMPA1+	O ₇₈	10	5×10^7	0	0	100
	OMPA2+OMPA3	O ₁	10	5×10^7	0	0	100
		O ₂	10	5×10^7	0	0	100
		RA1	10	1×10^8	10	9	0
	对照组三	RA2	10	1×10^8	10	9	0
	OMPA1+	O ₇₈	10	5×10^7	10	8	0
	OMPA2+OMPA3	O ₁	10	5×10^7	10	8	0
		O ₂	10	5×10^7	10	10	0
28		RA1	10	1×10^8	0	0	100
	免疫组一	RA2	10	1×10^8	7	5	30
	OMPA1+OMPA3	O ₇₈	10	5×10^7	0	0	100
		O ₁	10	5×10^7	1	0	90
		O ₂	10	5×10^7	0	0	100
	对照组一	RA1	10	1×10^8	10	7	0
	OMPA1+OMPA3	RA2	10	1×10^8	10	6	0
		O ₇₈	10	5×10^7	10	9	0
		O ₁	10	5×10^7	10	7	0

		O₂	10	5×10⁷	10	10	0
		RA1	10	1×10⁸	7	4	30
	免疫组二	RA2	10	1×10⁸	0	0	100
	OMPA2+OMPA3	O₇₈	10	5×10⁷	0	0	100
		O₁	10	5×10⁷	0	0	100
		O₂	10	5×10⁷	1	1	90
		RA1	10	1×10⁸	10	6	0
	对照组二	RA2	10	1×10⁸	10	7	0
	OMPA2+OMPA3	O₇₈	10	5×10⁷	10	10	0
		O₁	10	5×10⁷	10	7	0
		O₂	10	5×10⁷	10	9	0
		RA1	10	1×10⁸	0	0	100
	免疫组三	RA2	10	1×10⁸	0	0	100
	OMPA1+	O₇₈	10	5×10⁷	0	0	100
	OMPA2+OMPA3	O₁	10	5×10⁷	1	0	90
		O₂	10	5×10⁷	0	0	100
[0137]		RA1	10	1×10⁸	10	8	0
	对照组三	RA2	10	1×10⁸	10	6	0
	OMPA1+	O₇₈	10	5×10⁷	10	10	0
	OMPA2+OMPA3	O₁	10	5×10⁷	10	8	0
		O₂	10	5×10⁷	10	10	0
60		RA1	10	1×10⁸	1	0	90
	免疫组一	RA2	10	1×10⁸	7	3	30
	OMPA1+OMPA3	O₇₈	10	5×10⁷	2	2	80
		O₁	10	5×10⁷	3	2	70
		O₂	10	5×10⁷	3	3	70
		RA1	10	1×10⁸	10	4	0
	对照组一	RA2	10	1×10⁸	10	5	0
	OMPA1+OMPA3	O₇₈	10	5×10⁷	10	9	0
		O₁	10	5×10⁷	10	8	0
		O₂	10	5×10⁷	10	10	0
	免疫组二	RA1	10	1×10⁸	8	2	20
	OMPA2+OMPA3	RA2	10	1×10⁸	1	0	90

[0138]

	O₇₈	10	5×10⁷	2	1	80
	O₁	10	5×10⁷	3	3	70
	O₂	10	5×10⁷	2	2	80
对照组二 OMPA2+OMPA3	RA1	10	1×10⁸	10	4	0
	RA2	10	1×10⁸	10	4	0
	O₇₈	10	5×10⁷	10	9	0
	O₁	10	5×10⁷	10	7	0
	O₂	10	5×10⁷	10	10	0
免疫组三 OMPA1+ OMPA2+OMPA3	RA1	10	1×10⁸	1	0	90
	RA2	10	1×10⁸	1	1	90
	O₇₈	10	5×10⁷	2	2	80
	O₁	10	5×10⁷	3	2	70
	O₂	10	5×10⁷	3	3	70
对照组三 OMPA1+ OMPA2+OMPA3	RA1	10	1×10⁸	10	4	0
	RA2	10	1×10⁸	10	3	0
	O₇₈	10	5×10⁷	10	9	0
	O₁	10	5×10⁷	10	8	0
	O₂	10	5×10⁷	10	10	0

[0001]

序列表

<110> 北京大北农科技集团股份有限公司；福建省农科院畜牧兽医研究所；福州大北农生物技术有限公司

<120> 鸭疫里氏杆菌和大肠杆菌外膜蛋白二联疫苗及其制备方法

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gctggatcca tgggtaaaga atttatg

27

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

agtctcgagt ettacaagaa gaggacgett

30

<210> 3

[0002]

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

atggatccgc tccgaaagat aac

23

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

atactcgagt taagcctgcg gctgagt

27

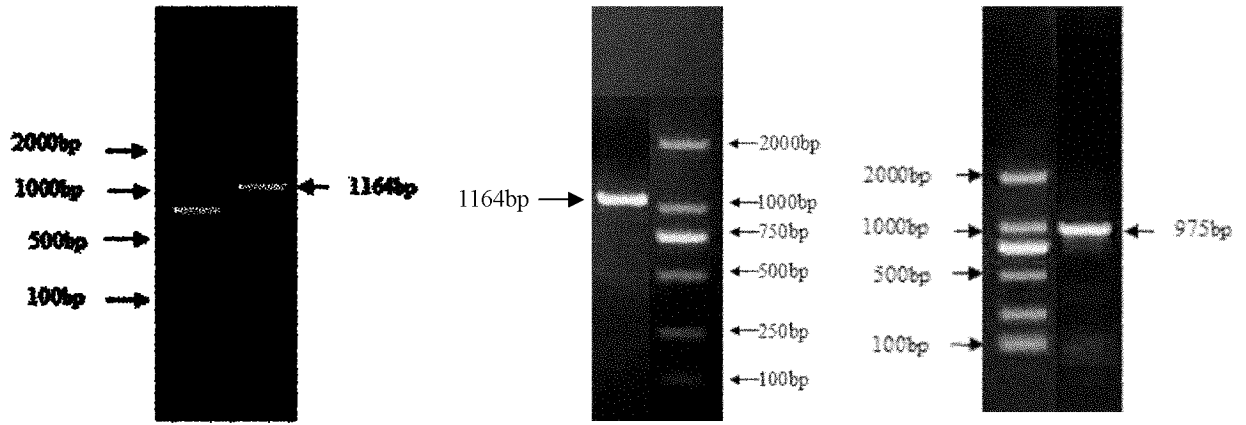


图 1

图 2

图 3

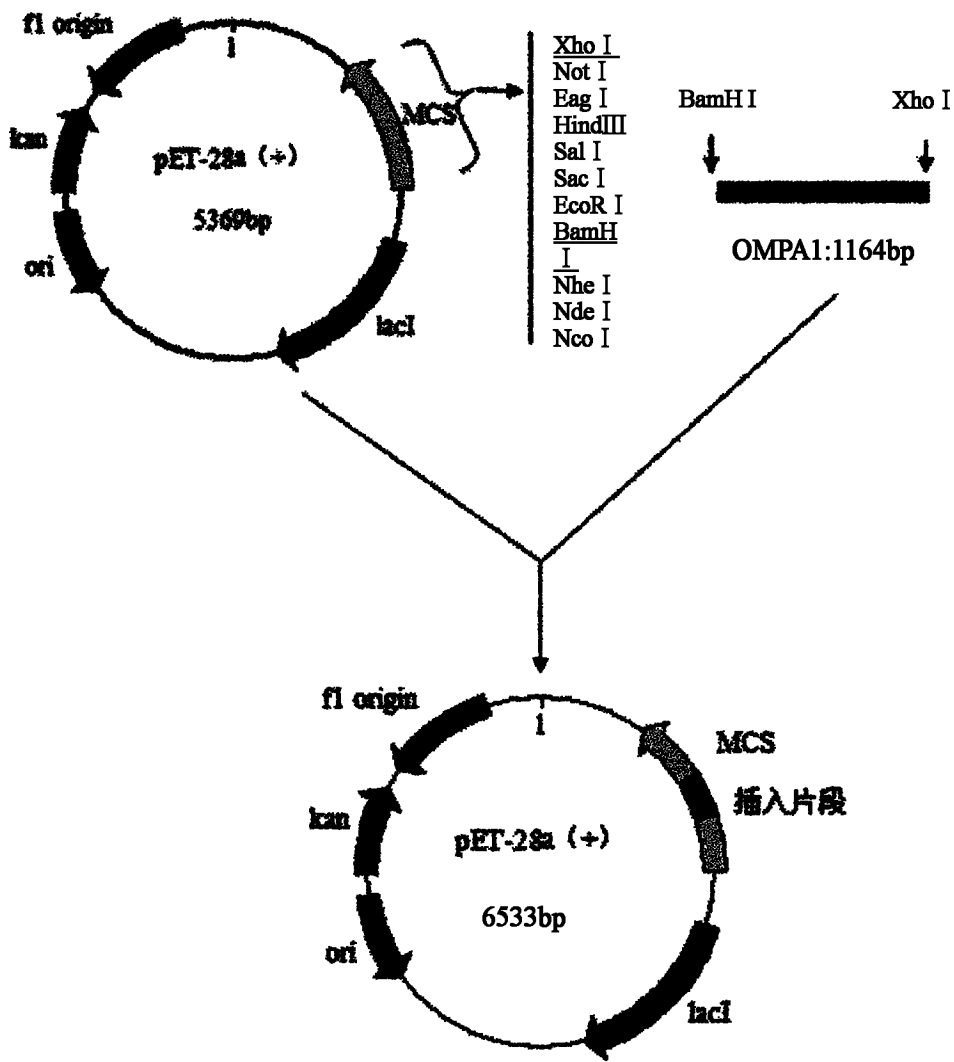


图 4

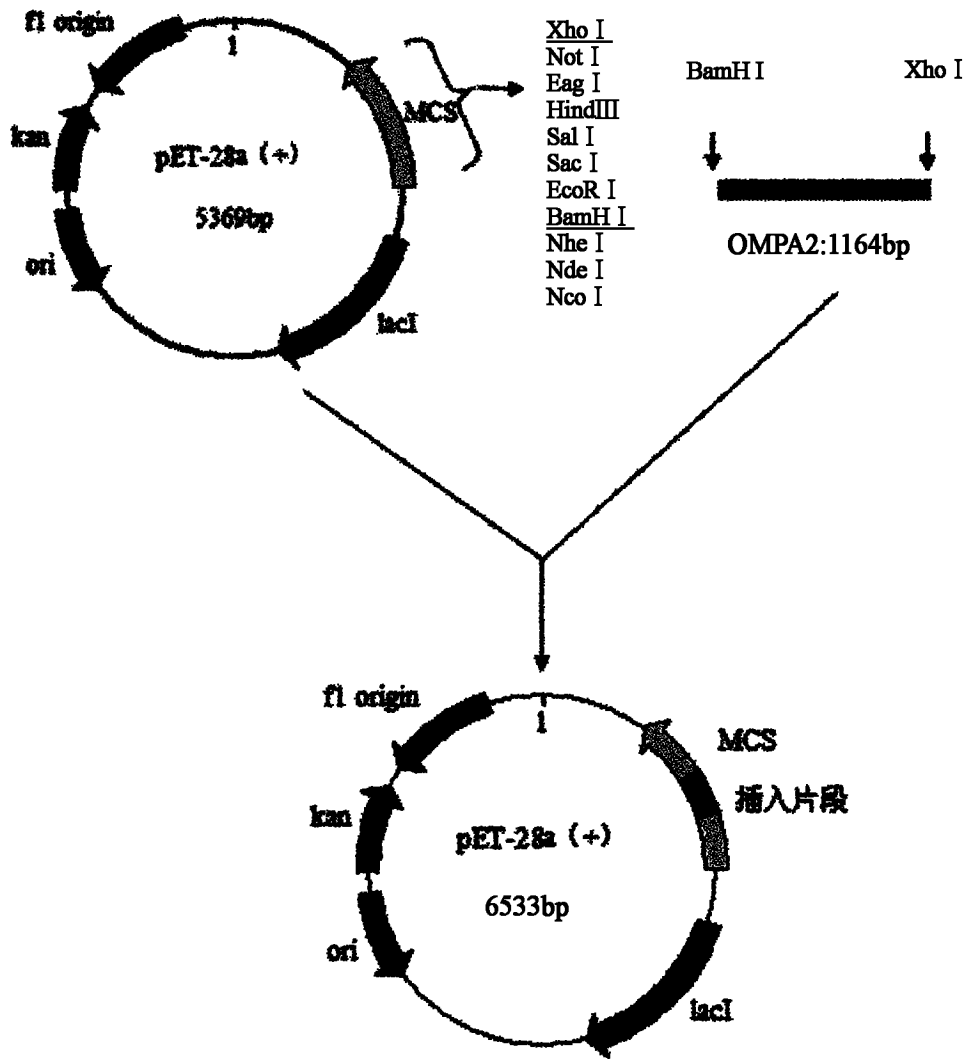


图 5

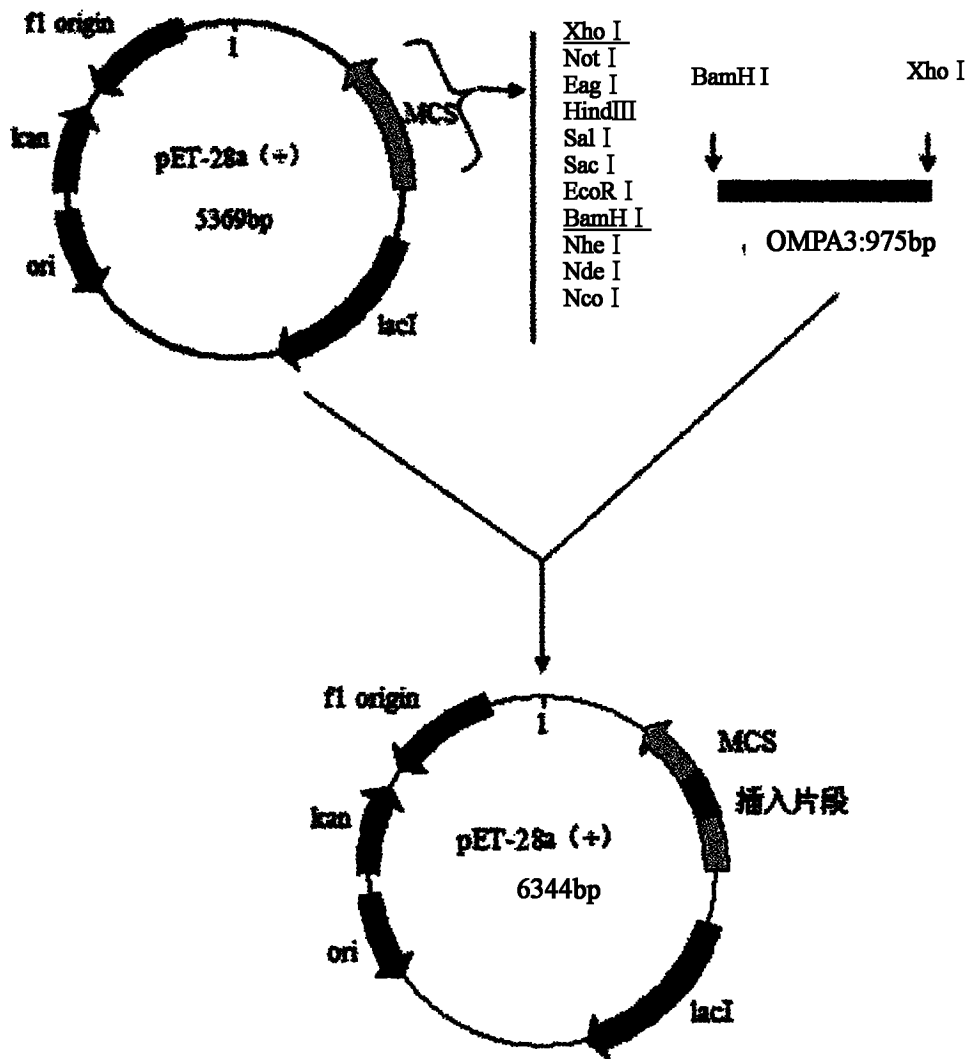


图 6