



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109943507 B

(45) 授权公告日 2021.08.17

(21) 申请号 201910230951.0

C07K 14/33 (2006.01)

(22) 申请日 2019.03.26

A61K 39/08 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/39 (2006.01)

申请公布号 CN 109943507 A

A61P 31/04 (2006.01)

C12R 1/145 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.06.28

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国兽医药品监察所

CN 1842588 A, 2006.10.04

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街8号

赵立峰等. A型产气荚膜杆菌产毒条件的测定.《经济动物学报》.2005, (第02期),

(72) 发明人 彭小兵 彭国瑞 李旭妮 蒋玉文

高文伟等. 产气荚膜梭菌的分离鉴定.《山西农业大学学报(自然科学版)》.2008, (第01期),

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

余华等. A型产气荚膜毒素培养工艺研究.《湖北农业科学》.2009, (第09期),

代理人 关畅

审查员 吴静

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

一种兽用A型产气荚膜梭菌类毒素的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种兽用A型产气荚膜梭菌类毒素的制备方法及其应用。所述类毒素制备方法如下：将A型产气荚膜梭菌生产菌株接种于培养基中发酵培养，得到发酵产物，然后将发酵产物在L-赖氨酸、甲醛水溶液和pH6.8下灭活脱毒，灭活脱毒合格的菌液离心上清即为类毒素。所述培养基包括如下物质：酪蛋白胨、酵母浸粉、CaCl₂、ZnSO₄·7H₂O、Na₂HPO₄·12H₂O、KH₂PO₄、葡萄糖。按本发明方法制备的A型产气荚膜梭菌毒素的毒力最高可提至制苗标准的12.5倍，用其制备的类毒素在家兔上的一免、二免血清中和效价也分别最高可提至传统工艺的4和50倍，血清效价成本比可最高提至传统工艺的48.8、1216.4倍。

1. 一种A型产气荚膜梭菌发酵培养基,包括溶质;所述溶质由如下物质组成:酪蛋白胨、酵母浸粉、 CaCl_2 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 和葡萄糖;酪蛋白胨、酵母浸粉、 CaCl_2 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 和葡萄糖的质量比为(20-30):(10-15):(0.075-0.1):(0.0014-0.0028):(5-7.5):(0.5-0.75):10。

2. 根据权利要求1所述的培养基,其特征在于:酪蛋白胨、酵母浸粉、 CaCl_2 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 和葡萄糖的质量比为30:15:0.1:0.0014:5:0.5:10。

3. 根据权利要求1或2所述的培养基,其特征在于:所述培养基还包括溶剂。

4. 根据权利要求3所述的培养基,其特征在于:所述溶剂为水;所述培养基由酪蛋白胨、酵母浸粉、 CaCl_2 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、葡萄糖和水组成;酪蛋白胨在所述培养基中的浓度为20-30 g/L;酵母浸粉在所述培养基中的浓度为10-15 g/L; CaCl_2 在所述培养基中的浓度为0.075-0.1 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在所述培养基中的浓度为0.0014-0.0028 g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 在所述培养基中的浓度为5-7.5 g/L; KH_2PO_4 在所述培养基中的浓度为0.5-0.75 g/L;葡萄糖在所述培养基中的浓度为10-15 g/L。

5. 根据权利要求4所述的培养基,其特征在于:酪蛋白胨在所述培养基中的浓度为30 g/L;酵母浸粉在所述培养基中的浓度为15 g/L; CaCl_2 在所述培养基中的浓度为0.1 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在所述培养基中的浓度为0.0014g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 在所述培养基中的浓度为5 g/L; KH_2PO_4 在所述培养基中的浓度为0.5 g/L;葡萄糖在所述培养基中的浓度为10g/L;培养基的pH值为7.5-7.7。

6. 一种制备权利要求1-5任一所述的培养基的方法,包括如下步骤:将权利要求1-5任一所述的培养基中除葡萄糖外其余各组分按照质量比与水混匀,并调节pH值至7.5-7.7,灭菌后,再将葡萄糖单独配制成50%葡萄糖水溶液灭菌,使用前加入至所需浓度,得到培养基。

7. 权利要求1-5任一所述的培养基或权利要求6所述的方法在制备A型产气荚膜梭菌毒素和/或A型产气荚膜梭菌类毒素中的应用。

8. 一种制备A型产气荚膜梭菌毒素的方法,包括如下步骤:将A型产气荚膜梭菌生产菌株在权利要求1-5任一所述的培养基中发酵培养,得到发酵产物;收集发酵产物的上清液,得到A型产气荚膜梭菌毒素;

或,一种制备A型产气荚膜梭菌类毒素的方法,包括如下步骤:将A型产气荚膜梭菌生产菌株在权利要求1-5任一所述的培养基中发酵培养,得到发酵产物;将所述发酵产物灭活脱毒,得到A型产气荚膜梭菌类毒素;所述灭活脱毒的方法包括如下步骤:将所述发酵产物与L-赖氨酸、甲醛水溶液混匀,在pH值为6.8-6.9的条件下,36-37 °C灭活脱毒7-8天。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述发酵培养的条件如下:35-37 °C发酵培养5-6 h,且发酵过程中维持pH值为 6.9 ± 0.05 ,且发酵培养至4-5 h时按培养基总体积1-1.2 %加入50%葡萄糖水溶液,且发酵过程中控制转速为25-30 rpm。

10. 由权利要求8或9所述的方法制备得到的A型产气荚膜梭菌类毒素在制备治疗和/或预防由A型产气荚膜梭菌所致疾病的产品中的应用;

或,由权利要求8或9所述的方法制备得到的A型产气荚膜梭菌类毒素在制备A型产气荚膜梭菌毒素类毒素疫苗中的应用。

11. 一种制备A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗的方法,包括如下步骤:

1) 将A型产气荚膜梭菌生产菌株在权利要求1-5任一所述的培养基中发酵培养,得到发

酵产物；

2) 将所述发酵产物与L-赖氨酸、甲醛水溶液混匀,在pH值为6.8-6.9的条件下,36-37℃灭活脱毒7-8天,得到灭活脱毒后菌液；

3) 将所述灭活脱毒后菌液离心,收集上清液；将所述上清液浓缩后加铝胶佐剂,得到所述A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗。

一种兽用A型产气荚膜梭菌类毒素的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于兽用生物制品领域,具体涉及一种兽用A型产气荚膜梭菌类毒素的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 产气荚膜梭菌(*C.perfringens*)旧名魏氏梭菌(*C.welchii*)或产气荚膜杆菌(*Bacillus perfringens*),是引起各种动物坏死性肠炎、肠毒血症,人类的食物中毒和创伤性气性坏疽的主要病原菌之一,广泛分布于土壤及动物的消化道内。该菌能产生强烈毒性的外毒素和一些与侵袭力有关的酶类,有的菌株还可产生肠毒素、溶血素和血凝素等。传统上以其产生的4种主要外毒素的不同,可将其分为A(α)、B(α 、 β 、 ϵ)、C(α 、 β)、D(α 、 ϵ)、E(α 、 ι)5个型(陆承平.兽医微生物学[M].北京:中国农业出版社,2013:194-196.)。产气荚膜梭菌 α 毒素(CPA)在各型菌都产生,以A型菌表达水平最高,是最基本最重要的毒力因子,分子质量为42.528kDa,是锌依赖蛋白酶。A型产气荚膜梭菌是引起创伤性气性坏疽的重要致病菌,是潜在的毒素战剂之一。此外,A型产气荚膜梭菌对我国养殖业亦构成严重威胁,每年各地仔猪红痢、反刍动物的坏死性肠炎或肠毒血症的发病率成上升趋势。最近发现,A型产气荚膜梭菌可能是家畜“猝死症”的主要致病菌。

[0003] 欧美预防该病的生物制品有A型产气荚膜梭菌类毒素(Animal and Plant Health Inspection Service,USDA.9 CFR Ch.I(1-1-07 Edition)[S].Washington:U.S.GOVERNMENT PRINTING OFFICE,2007.3、British Pharmacopoeia(Veterinary)[S].London:The Stationery Office,2005.);我国含有该组分的疫苗包括:兔产气荚膜梭菌病(A型)灭活疫苗(每年约271.4万头份)和仔猪产气荚膜梭菌病二价灭活疫苗(A、C型)(每年约31.4万头份)。目前市场上使用的疫苗普遍以牛肉和肝脏的酶消化液为原材料来制备培养基,用这种方法制备培养基其制备过程繁琐、耗时长、需要人力多,尤为重要是常因原材料质量参差不齐出现产毒性能不稳定的现象,这影响了疫苗的质量,也给疫苗生产带来了极大的浪费和高额的成本。另外,致病性梭菌的毒力与免疫效果有明显的正相关性。破伤风梭菌、诺维梭菌和肉毒梭菌的产毒能力较强,其制苗时规定的毒力标准分别至少为2000000MLD/mL、2000MLD/mL、50000MLD/mL,效力检验规定的攻毒剂量分别为300MLD、50MLD和10MLD;产气荚膜梭菌的产毒能力相对较弱,质量标准中效力检验规定的攻毒剂量为1MLD。而在A、B、C、D型产气荚膜梭菌中,D型菌的产毒能力最强(1333~10000MLD/mL),A型菌的产毒能力最弱(10~100MLD/mL),A型产气荚膜梭菌疫苗的免疫保护效果也相对最差(中国兽药典委员会编.中华人民共和国兽药典二〇一〇年版三部[S].北京:中国农业出版社,2011;农业部兽用生物制品规程委员会编.中华人民共和国兽用生物制品规程二〇〇〇版[S].北京:化学工业出版社,2000)。因此,研发出质量可靠、产毒力高、稳定性好且成本低廉的A型产气荚膜梭菌毒素制备方法及其可产生良好免疫效果的类毒素显得尤为必要和迫切。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种兽用A型产气荚膜梭菌类毒素的制备方法及应用。

[0005] 第一方面,本发明提供了一种A型产气荚膜梭菌发酵培养基。

[0006] 本发明提供的A型产气荚膜梭菌发酵培养基,包括溶质;所述溶质由如下物质组成:酪蛋白胨、酵母浸粉、 CaCl_2 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 和葡萄糖。

[0007] 进一步的,所述酪蛋白胨、所述酵母浸粉、所述 CaCl_2 、所述 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、所述 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、所述 KH_2PO_4 和所述葡萄糖的质量比可为(20-30):(10-15):(0.075-0.1):(0.0014-0.0028):(5-7.5):(0.5-0.75):10。

[0008] 更进一步的,所述酪蛋白胨、所述酵母浸粉、所述 CaCl_2 、所述 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、所述 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、所述 KH_2PO_4 和所述葡萄糖的质量比为30:15:0.1:0.0014:5:0.5:10。

[0009] 上述培养基中,所述培养基还包括溶剂;所述溶剂具体可为水。

[0010] 所述培养基由所述酪蛋白胨、所述酵母浸粉、所述 CaCl_2 、所述 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、所述 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、所述 KH_2PO_4 和所述葡萄糖和水组成;

[0011] 进一步的,

[0012] 所述酪蛋白胨在所述培养基中的浓度为20-30g/L;

[0013] 所述酵母浸粉在所述培养基中的浓度为10-15g/L;

[0014] 所述 CaCl_2 在所述培养基中的浓度为0.075-0.1g/L;

[0015] 所述 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在所述培养基中的浓度为0.0014-0.0028g/L;

[0016] 所述 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 在所述培养基中的浓度为5-7.5g/L;

[0017] 所述 KH_2PO_4 在所述培养基中的浓度为0.5-0.75g/L;

[0018] 所述葡萄糖在所述培养基中的浓度为10-15g/L。

[0019] 更进一步的,

[0020] 所述酪蛋白胨在所述培养基中的浓度为30g/L;

[0021] 所述酵母浸粉在所述培养基中的浓度为15g/L;

[0022] 所述 CaCl_2 在所述培养基中的浓度为0.1g/L;

[0023] 所述 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在所述培养基中的浓度为0.0014g/L;

[0024] 所述 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 在所述培养基中的浓度为5g/L;

[0025] 所述 KH_2PO_4 在所述培养基中的浓度为0.5g/L;

[0026] 所述葡萄糖在所述培养基中的浓度为10g/L。

[0027] 上述培养基中,所述培养基的pH值为7.5-7.7。

[0028] 第二方面,本发明提供了一种制备上述培养基的方法。

[0029] 本发明提供的制备上述培养基的方法包括如下步骤:将上述培养基中除葡萄糖外其余各组分按照质量比与水混匀,并调节pH值至7.5-7.7,灭菌后,再将葡萄糖单独配制成50%葡萄糖水溶液灭菌,使用前加入至所需浓度,得到培养基。

[0030] 进一步的,使用前加入50%葡萄糖水溶液,使葡萄糖在培养基中的终浓度为0.5%。

[0031] 上述制备培养基的方法中,在溶解溶质的过程中,可通过加热的方式使物质充分溶解和/或加速溶解。

[0032] 上述制备培养基的方法中,所述调节pH值具体可采用10M的氢氧化钠溶液进行调

节。

[0033] 上述制备培养基的方法中,所述培养基灭菌的条件可为116℃高压灭菌30min,50%葡萄糖水溶液灭菌的条件可为110℃高压灭菌40min。

[0034] 上述制备培养基的方法中,所述水优选为纯化水。

[0035] 上述培养基或上述制备培养基的方法在制备A型产气荚膜梭菌毒素和/或A型产气荚膜梭菌类毒素中的应用也属于本发明保护的范畴。

[0036] 第三方面,本发明提供了一种制备A型产气荚膜梭菌毒素的方法。

[0037] 本发明提供的制备A型产气荚膜梭菌毒素的方法包括如下步骤:将A型产气荚膜梭菌生产菌株在上述培养基中发酵培养,得到发酵产物;收集发酵产物的上清液,得到A型产气荚膜梭菌毒素。

[0038] 上述制备A型产气荚膜梭菌毒素的方法中,所述A型产气荚膜梭菌生产菌株具体可为兽用A型产气荚膜梭菌C57-1菌株(CVCC编号:37),购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心(www.cvcc.org.cn,简称CVCC)。

[0039] 上述制备A型产气荚膜梭菌毒素的方法中,所述发酵培养的条件为如下:35-37℃发酵培养5-6h,且发酵过程中维持pH值为 6.9 ± 0.05 ,且发酵培养至4-5h时按培养基总体积1-1.2%加入50%葡萄糖水溶液,且发酵过程中控制转速为25-30rpm。

[0040] 上述制备A型产气荚膜梭菌毒素的方法中,所述A型产气荚膜梭菌生产菌株在发酵培养前还包括如下步骤:制备A型产气荚膜梭菌生产菌株种子液。

[0041] 进一步的,制备A型产气荚膜梭菌生产菌株种子液可按照如下方法进行:

[0042] A-1)将真空度良好的冻干菌种用无菌的菌种培养基(不含葡萄糖)溶解后按1%的接种量接种至菌种培养基(不含葡萄糖),37℃培养12-14小时,得到一级种子;

[0043] A-2)将所述一级种子按1-2%接种量接种菌种培养基(接种前,加入质量分数为50%葡萄糖水溶液,使葡萄糖的终浓度为0.9%),37℃培养9-11小时,得到二级种子,即为A型产气荚膜梭菌生产菌株种子液。

[0044] 更进一步的,所述A型产气荚膜梭菌生产菌株种子液的接种量可为4-5%(体积分数)。

[0045] 所述菌种培养基的配方如下:溶剂为水;溶质及浓度为:30g/L酪蛋白胨、15g/L酵母浸粉、10mM Na_2CO_3 、40mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、10mM KH_2PO_4 ,pH为7.5。

[0046] 上述制备A型产气荚膜梭菌毒素的方法中,收集发酵产物的上清液为将所述发酵产物进行离心,收集上清,将所述上清过滤后,得到滤液,若所述滤液接种厌气肉肝汤无菌生长,则该滤液即为A型产气荚膜梭菌毒素(若有菌生长,再次过滤,直到无菌生长)。

[0047] 进一步的,所述离心的条件为10000r/min离心60min;所述过滤为用0.22 μm 滤膜过滤。

[0048] 由上述方法制备得到的A型产气荚膜梭菌毒素也属于本发明的保护范围。

[0049] 第四方面,本发明提供了一种制备A型产气荚膜梭菌类毒素的方法。

[0050] 本发明提供的制备A型产气荚膜梭菌类毒素的方法包括如下步骤:将上述A型产气荚膜梭菌毒素灭活脱毒,得到A型产气荚膜梭菌类毒素。

[0051] 进一步的,所述制备A型产气荚膜梭菌类毒素的方法包括如下步骤:

[0052] 1)将A型产气荚膜梭菌生产菌株在上述培养基中发酵培养,得到发酵产物;

[0053] 2) 将所述发酵产物与L-赖氨酸、甲醛水溶液混匀,在pH值为6.8-6.9的条件下,36-37°C灭活脱毒7-8天,得到灭活脱毒后菌液。

[0054] 更进一步的,

[0055] 所述1)中,所述发酵培养的条件如下:35-37°C发酵培养5-6h,且发酵过程中维持pH值为 6.9 ± 0.05 ,且发酵培养至4-5h时按培养基总体积1-1.2%加入50%葡萄糖水溶液,且发酵过程中控制转速为25-30rpm。

[0056] 所述2)中,向所述发酵产物中加入L-赖氨酸,使其在发酵产物中的质量分数为0.7%;溶解混匀后,按体积分数为0.5%的比例加入甲醛水溶液(40%);加10M氢氧化钠调pH值至6.8,37°C灭活脱毒7天。

[0057] 所述2)还包括对灭活脱毒后菌液的灭活和脱毒效果进行检测的步骤。

[0058] 所述灭活效果可按照如下方法检测:将灭活脱毒后菌液分别接种厌气肉肝汤、普通肉汤、普通琼脂斜面,在37°C条件下培养,观察5日均无菌生长表明灭活完全。

[0059] 所述脱毒效果可按照如下方法检测:将灭活脱毒后菌液3000r/min离心30min,弃菌体沉淀,留上清,将上清用0.22 μ m滤膜过滤,收集滤液,再尾静脉注射16-18g ICR小白鼠2只,每只注射0.4ml,观察3日均健活表明脱毒完全。

[0060] 由上述方法制备得到的A型产气荚膜梭菌类毒素也属于本发明的保护范围。

[0061] 第五方面,本发明提供如下任一应用:

[0062] (I) 上述A型产气荚膜梭菌类毒素在制备治疗和/或预防由A型产气荚膜梭菌所致疾病的产品中的应用;

[0063] (II) 上述A型产气荚膜梭菌类毒素在制备A型产气荚膜梭菌毒素类毒素疫苗中的应用。

[0064] 上述应用中,所述由A型产气荚膜梭菌所致疾病包括(但不限于)兔产气荚膜梭菌病、仔猪产气荚膜梭菌病、鸡坏死性肠炎、牛猝死症等。

[0065] 上述应用中,所述A型产气荚膜梭菌毒素类毒素疫苗具体选自(但不限于)下述至少一种:(1)兔产气荚膜梭菌病(A型)灭活疫苗;(2)仔猪产气荚膜梭菌病二价灭活疫苗(A、C型);(3)兔病毒性出血症、巴氏杆菌病、A型产气荚膜梭菌病三联灭活疫苗。

[0066] 第六方面,本发明提供了一种A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗。

[0067] 本发明提供的A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗的活性成分为上述A型产气荚膜梭菌类毒素。

[0068] 进一步的,所述A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗由上述A型产气荚膜梭菌类毒素和佐剂组成。

[0069] 更进一步的,所述佐剂为铝胶佐剂。

[0070] 第七方面,本发明提供了一种制备A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗的方法。

[0071] 本发明提供的制备A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗的方法包括如下步骤:

[0072] 1) 将A型产气荚膜梭菌生产菌株在上述培养基中发酵培养,得到发酵产物;

[0073] 2) 将所述发酵产物与L-赖氨酸、甲醛水溶液混匀,在pH值为6.8-6.9的条件下,36-37°C灭活脱毒7-8天,得到灭活脱毒后菌液;

[0074] 3) 将所述灭活脱毒后菌液离心,收集上清液;将所述上清液浓缩后加铝胶佐剂,得到所述A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗。

[0075] 进一步的,

[0076] 所述1)中,所述发酵培养的条件如下:35-37℃发酵培养5-6h,且发酵过程中维持pH值为 6.9 ± 0.05 ,且发酵培养至4-5h时按培养基总体积1-1.2%加入50%葡萄糖水溶液,且发酵过程中控制转速为25-30rpm。

[0077] 所述2)中,向所述发酵产物中加入L-赖氨酸,使其在发酵产物中的质量分数为0.7%;溶解混匀后,按体积分数为0.5%的比例加入甲醛水溶液(40%);加10M氢氧化钠调pH值至6.8,37℃灭活脱毒7天。

[0078] 所述3)中,所述离心的条件为3000r/min离心30min;

[0079] 将所述上清液浓缩后加铝胶佐剂的方法可按照如下步骤进行:将所述上清液用5kDa的超滤膜进行10倍浓缩,得到浓缩后的A型产气荚膜梭菌类毒素;将所述浓缩后的A型产气荚膜梭菌类毒素加入装有高压灭菌铝胶的瓶中,再添加生理盐水定容至所需体积,调pH值至6.8,使铝胶的终浓度为20%(v/v),使A型产气荚膜梭菌类毒素的含量为1600MLD/mL。

[0080] 上述制备A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗的方法中,所述2)和所述3)之间还包括对灭活脱毒后菌液的灭活和脱毒效果进行检测的步骤。

[0081] 本发明通过筛选获得了以下述各组物质的质量配比(按生产1000mL培养基成品计算)为基础的产毒培养基:30g/L酪蛋白胨、15g/L酵母浸粉、0.1g/L CaCl_2 、0.0014g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g/L KH_2PO_4 、10g/L葡萄糖。该培养基发酵罐培养产毒能力强,产毒性能稳定,质量可控,配制使用方便,价格低廉。

[0082] 本发明以商品化的酪蛋白胨、酵母浸粉等成品作为原材料替代原有质量不可控的牛肉、牛肝等原材料,通过筛选培养基配方并优化产毒素培养条件,使培养基的产毒能力达到甚至超过原有规程标准并具备较好的可重复性。

[0083] 本发明在家兔上对疫苗的效果进行了评价。结果用本发明方法制备的A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗,可保护家兔免受该型毒素的攻击,血清中和效价也超过了《中国兽药典》的相应标准及传统工艺疫苗。

[0084] 本发明具有如下优点:本发明所使用的培养基配制方法简单(由原肉肝胃酶消化汤所需28小时缩减为5小时即可),成本低(综合成本为原传统工艺的0.37倍)。使用本发明的培养基按照本发明的方法制备的A型产气荚膜梭菌毒素的毒力最高可提至《中国兽用生物制品规程》标准的12.5倍,用其制备的类毒素在家兔上的一免、二免血清中和效价也分别最高可提至传统工艺的4和50倍,血清效价成本比可提至传统工艺的48.8、1216.4倍。本发明用于替换现有肉肝胃酶消化汤或厌气肉肝汤用于A型产气荚膜梭菌病灭活疫苗的生产具有广阔的前景。

附图说明

[0085] 图1为C57-1毒素灭活脱毒后的蛋白电泳图。1为改良灭活法(10倍浓缩);2为传统灭活法(10倍浓缩);3为改良灭活法(未浓缩);4为传统灭活法(未浓缩);M为蛋白Marker,从上至下依次为140kDa、115kDa、80kDa、65kDa、50kDa、40kDa、30kDa、25kDa、15kDa。

具体实施方式

[0086] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0087] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0088] 下面通过具体实施例对本发明的方法进行说明,但本发明并不局限于此,凡在本发明的精神和原则之内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0089] 下述实施例中所用的A型产气荚膜梭菌毒素制备用菌株具体为产气荚膜梭菌C57-1菌株(CVCC编号:37),购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心(www.cvcc.org.cn,简称CVCC)。

[0090] 下述实施例中所采用的厌气肉肝汤组成如表1所示。

[0091] 表1为厌气肉肝汤组成

[0092]	牛肉	250g
	肝(牛、羊或猪)	250g
	蛋白胨	10g
	氯化钠	5g
	葡萄糖	2g
	蒸馏水加至	1000ml

[0093] 厌气肉肝汤制备方法如下:

[0094] 1、取牛肉除去脂肪和筋膜,用绞肉机绞碎,与切成100g左右的牛肝块混合,加蒸馏水,充分搅拌后,冷浸20-24小时。

[0095] 2、煮沸20-60分钟,补足失去的水分,用白布滤过,弃去肉渣,取出肝块。

[0096] 3、滤液加入蛋白胨和氯化钠,加热融化,以氢氧化钠溶液调整pH 7.8-8.0,加热煮沸10-20分钟。

[0097] 4、用滤纸或绒布滤过,加入葡萄糖搅拌,使其融化。

[0098] 5、将煮过的肝块洗净,切成小方块,用蒸馏水充分冲洗后,分装于试管或中性玻璃瓶内,其量为预计分装肉肝汤量的1/10。

[0099] 6、将滤液分装于含有肝块的中性容器中(如为试管,还应加入适量液体石蜡),以116℃灭菌30-40分钟。

[0100] 该厌气肉肝汤供一般厌气菌培养及检验用。用于菌种保存时,不加葡萄糖。

[0101] 下述实施例中所采用的明胶缓冲液组分如表2所示。

[0102] 表2为明胶缓冲液组分

[0103]	蒸馏水	1000ml
	明胶	2g
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	9.25g
	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	8.34g

[0104] 明胶缓冲液配制方法:明胶蒸汽融化后,混合、煮开、滤过,116℃灭菌30分钟备用。

[0105] 下述实施例中所采用的普通肉汤培养基有新鲜培养基和干粉培养基两个配方,可任选其一。该培养基用于细菌类疫苗的检验,具体配方及配制方法如下:

[0106] 配方一:将蛋白胨10g、氯化钠5.0g、牛肉汤加至1000ml混合,微热溶解后放至室

温,调整pH值至7.4~7.6,滤清,分装,116℃灭菌30分钟,灭菌后培养基的pH值应为7.2~7.4。

[0107] 配方二:蛋白胨10g、牛肉浸粉5.0g、酵母浸粉5.0g、氯化钠5.0g、纯化水加至1000ml混合,微热溶解,将加热的培养基放至室温,调整pH值至7.4~7.6,分装,116℃灭菌30分钟,灭菌后培养基pH值为7.2~7.4。

[0108] 下述实施例中所采用的普通琼脂培养基配方及配制方法如下:将蛋白胨10g、氯化钠5.0g、琼脂12g、牛肉汤加至1000ml混合,然后加热溶解。待琼脂完全溶化后,以氢氧化钠溶液调整pH值至7.4~7.6。以卵白澄清法或凝固沉淀法除去沉淀。该培养基用于细菌类疫苗的检验。

[0109] 上述卵白澄清法除去沉淀的具体步骤如下:(1)取鸡蛋白2个,加等量纯化水,充分搅拌,加至1000ml 50℃左右的培养基中,搅匀。(2)置流通蒸汽锅内,加热1小时,使蛋白充分凝固。(3)取出,在蒸汽加温下以脱脂棉或滤纸滤过。

[0110] 上述凝固沉淀法除去沉淀的具体步骤如下:(1)将调整pH值后的琼脂培养基放入流通蒸汽锅中,通入少量蒸汽,经1小时左右后,使其逐渐冷却自行凝固。(2)待完全冷却后,将琼脂倾出,切去底层沉淀。(3)将上层透明部分,加热溶化后分装。

[0111] 实施例1、A型产气荚膜梭菌的培养及A型产气荚膜梭菌毒素的制备

[0112] 一、本发明A型产气荚膜梭菌的培养及A型产气荚膜梭菌毒素的制备

[0113] 本实施例涉及菌种培养基和发酵培养基如下:

[0114] 菌种培养基的溶剂为纯化水;溶质及浓度为:30g/L酪蛋白胨、15g/L酵母浸粉、10mM Na_2CO_3 、40mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、10mM KH_2PO_4 ,pH为7.5。分装成小管,110℃高压灭菌30min。

[0115] 发酵培养基的溶剂为纯化水;溶质及浓度为:30g/L酪蛋白胨、15g/L酵母浸粉、0.1g/L CaCl_2 、0.0014g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g/L KH_2PO_4 、10g/L葡萄糖,pH为7.5。116℃高压灭菌30min。

[0116] 上述发酵培养基的制备方法:将培养基中除葡萄糖外其余各组分与纯化水混匀,并调节pH值至7.5,116℃高压灭菌30min,再将葡萄糖配制成50%葡萄糖水溶液,110℃单独高压灭菌40min,使用前加入至所需浓度,得到本发明的发酵培养基。

[0117] 1、种子液的制备

[0118] 取真空度良好的冻干菌种,用无菌的菌种培养基(不含葡萄糖)溶解后按1%的接种量接种菌种培养基(不含葡萄糖),37℃静置培养12h,作为一级种子;取一级种子按1%的接种量接种菌种培养基(接种前,加入质量分数为50%葡萄糖水溶液,使葡萄糖的终浓度为0.9%),37℃静置培养9h,作为二级种子。

[0119] 2、生物反应器的发酵培养

[0120] 完成步骤1后,先向装有预先灭菌的发酵培养基(不含葡萄糖)的发酵罐中加入灭菌的质量分数为50%的葡萄糖水溶液,使葡萄糖终浓度为0.5%,并将pH调至6.9。然后按培养基总量的5%接入步骤1制备的二级种子,发酵温度为37℃,自动补碱(5M NaOH)维持pH值至6.9,搅拌转速设置为25rpm。培养5h时,补加质量分数为50%的葡萄糖水溶液,使葡萄糖终浓度为0.5%。发酵培养6h后,收获发酵产物。

[0121] 3、A型产气荚膜梭菌毒素的制备

[0122] 完成步骤2后,将步骤2制备的发酵产物以10000r/min离心60min,弃菌体沉淀留上清,将上清用0.22 μ m滤膜过滤,过滤后的滤液经接种厌氧肉肝汤无菌生长,则该过滤后的滤液即作为A型产气荚膜梭菌毒素(若有菌生长,再次过滤,直到无菌生长),分装成1mL的小份置-80 $^{\circ}$ C冰冻保存,每次取1小份冷水浴融化后用于测毒。

[0123] 4、测定培养完成后菌液中毒素对小白鼠的毒力

[0124] 完成步骤3后,取步骤3得到的A型产气荚膜梭菌毒素冷水浴融化后,用明胶缓冲液按如下表3所示的方法稀释,获得毒素稀释液。

[0125] 将毒素稀释液尾静脉注射清洁级16-18g ICR小白鼠,每滴度注射2只,每只注射0.2mL,观察小鼠在注射后72h内的死亡情况。能使小鼠发生2/2死亡的最小毒素量即为A型产气荚膜梭菌毒素对小鼠的MLD。对生产3批的毒素分别进行毒力测定。

[0126] 表3为明胶缓冲液稀释毒素

[0127]

管号	明胶缓冲液	毒素	0.2mL稀释液中毒素原液的含量
1	9.0mL	原液1.0mL	0.02mL
2	1.0mL	管1液1.0mL	0.01mL
3	3.0mL	管1液1.0mL	0.005mL
4	4.0mL	管1液1.0mL	0.004mL
5	5.1mL	管1液0.9mL	0.003mL
6	9.0mL	管1液1.0mL	0.002mL

[0128] 结果如表4所示。由结果可知,3批试验的毒力均远远超过了《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版规定的A型产气荚膜梭菌C57-1菌株“1个小鼠MLD为A型产气荚膜梭菌0.05-0.01mL毒素原液”的毒力标准。

[0129] 表4为发酵罐培养产毒结果汇总

[0130]

试验批数	对小鼠的最小致死量 (mL)
第1批	0.005
第2批	0.004
第3批	0.004

[0131] 二、传统培养基及培养工艺培养A型产气荚膜梭菌及A型产气荚膜梭菌毒素的制备

[0132] 以兽用A型产气荚膜梭菌C57-1菌株(CVCC编号:37)作为A型产气荚膜梭菌生产菌株,使用传统培养基及培养工艺培养A型产气荚膜梭菌,并制备A型产气荚膜梭菌毒素。传统培养基及培养工艺培养A型产气荚膜梭菌及A型产气荚膜梭菌毒素的制备方法参见文献“农业部兽用生物制品规程委员会编.中华人民共和国兽用生物制品规程.二〇〇〇版[S].北京:化学工业出版社,2000.”第101-102页。

[0133] 传统培养基(肉肝胃酶消化汤或厌氧肉肝汤)中的产毒结果汇总如表5所示。结果表明,与传统培养基及培养工艺相比,本发明的发酵培养基及发酵工艺产毒能力强,重复性好,可作为A型产气荚膜梭菌制苗用首选产毒培养基。

[0134] 表5为在传统培养基(肉肝胃酶消化汤或厌氧肉肝汤)中的产毒结果汇总

[0135]

试验批数	培养基	对小鼠的最小致死量 (mL)
1	肉肝胃酶消化汤	>0.01

2	肉肝胃酶消化汤	>0.05
3	肉肝胃酶消化汤	0.025
4	厌气肉肝汤	0.025
5	肉肝胃酶消化汤	0.02
6	肉肝胃酶消化汤	>0.05
7	厌气肉肝汤	>0.05
8	肉肝胃酶消化汤	0.05
9	肉肝胃酶消化汤	0.05
10	肉肝胃酶消化汤	0.025
11	肉肝胃酶消化汤	0.06

[0136] 实施例2、A型产气荚膜梭菌类毒素及A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗的制备

[0137] 1、A型产气荚膜梭菌的灭活及毒素的脱毒

[0138] 传统灭活法：向实施例1步骤一中得到的发酵产物，按体积分数为0.5%的比例加入甲醛水溶液(40%)，37℃灭活脱毒7天，得到灭活脱毒后菌液。

[0139] 改良灭活法：向实施例1步骤一中得到的发酵产物中加入L-赖氨酸，使其在发酵产物中的质量分数为0.7%，溶解混匀后，按体积分数为0.5%的比例加入甲醛水溶液(40%)，用10M氢氧化钠调pH值至6.8，37℃灭活脱毒7天，得到灭活脱毒后菌液。

[0140] 2、A型产气荚膜梭菌毒素灭活脱毒效果检测

[0141] (1) 将步骤1获得的灭活脱毒后菌液分别接种厌气肉肝汤、普通肉汤、普通琼脂斜面，在37℃条件下培养，观察5日均无菌生长表明灭活完全。

[0142] (2) 将步骤1获得的灭活脱毒后菌液3000r/min离心30min，弃菌体沉淀留上清，将上清用0.22μm滤膜过滤，收集滤液，再尾静脉注射16-18g ICR小白鼠2只，每只注射滤过的原液0.4ml，观察3日均健活表明脱毒完全。

[0143] 3、SDS-PAGE电泳检测灭活脱毒后菌液

[0144] 将步骤1传统灭活法、改良灭活法灭活脱毒后获得的灭活脱毒后菌液3000r/min离心30min，弃菌体沉淀，留上清；向上清中分别加蛋白电泳上样缓冲液，煮沸10分钟后进行SDS-PAGE电泳。结果如图1所示，与传统灭活法相比，改良灭活法保留了更多的蛋白抗原。

[0145] 4、A型产气荚膜梭菌类毒素的制备

[0146] 取步骤2得到的灭活脱毒完全的菌液3000r/min离心30min，弃菌体沉淀，留上清，得到A型产气荚膜梭菌类毒素，并将A型产气荚膜梭菌类毒素用5kDa的超滤膜进行10倍浓缩，得到浓缩后的A型产气荚膜梭菌类毒素，置2~8℃保存备用。

[0147] 5、A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗的制备

[0148] 取步骤4获得的浓缩后的A型产气荚膜梭菌类毒素加入装有高压灭菌铝胶(PI Pharma公司产品，货号为VAC 20 HA)的瓶中，再添加生理盐水定容至所需体积，调pH值至6.8，使铝胶的终浓度为20% (v/v)，使类毒素的含量为1600MLD/mL。振摇混匀，置2~8℃冰箱保存备用，得到A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗。

[0149] 实施例3、A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗在家兔上的免疫效果检测

[0150] 将实施例2制备的A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗、传统工艺疫苗(传统工艺疫苗为按《中国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版101-102页制备的疫苗)、商品苗(兔产气荚膜梭

菌病(A型)灭活疫苗,山东华宏生物工程有限公司,201801001批)分别颈背部皮下注射家兔各4只,分别免疫不同的剂量(如表6所示),同时设2只未免疫家兔作为对照,免疫后21日进行第二次免疫(免疫剂量及接种方式同首免)。免疫前、首免后21日、35日对每只家兔进行耳中动脉采血5mL,分离血清,按《中国兽药典》的方法测定每组4只家兔混合血清分别对A型产气荚膜梭菌毒素的中和效价(具体参见:中国兽药典委员会编.中华人民共和国兽药典2015年版三部[S].北京:中国农业出版社,2016:44-49.),血清效价是指“0.1mL血清能中和的小鼠MLD(最小致死剂量)数”。首免后38日,对各个免疫组、对照组家兔进行攻毒,每只家兔耳静脉注射2个家兔MLD的A型产气荚膜梭菌C57-1株毒素,观察10日。

[0151] 对免疫前家兔血清进行测定,结果表明:对A型产气荚膜梭菌毒素中和效价均小于1,均为抗体阴性兔。将不同组别的疫苗分别免疫家兔后,测定每组4只家兔混合血清对A型产气荚膜梭菌毒素的中和效价。结果表明:对于A型产气荚膜梭菌毒素,传统工艺苗、商品苗的一免血清效价未达到1,二免血清效价为1;而本发明方法疫苗的一免血清效价最高为4、二免血清效价大幅升高至50,均比传统工艺苗或商品苗有极显著提高(表6)。两次免疫后,用2个家兔致死量的A型产气荚膜梭菌毒素耳静脉注射进行攻毒,所有疫苗组别的家兔均获得100%保护。

[0152] 表6为A型产气荚膜梭菌类毒素疫苗在家兔上血清效价测定及免疫攻毒保护结果

组别	免疫剂量	对A型产气荚膜梭菌毒素的混合血清中和效价/(MLDs·0.1 mL ⁻¹)		免疫攻毒结果
		一免	二免	
本发明方法疫苗	1600MLD/只家兔	4	50	4/4 保护
	320MLD/只家兔	2	15	4/4 保护
	160MLD/只家兔	3	10	4/4 保护
传统工艺疫苗	1600MLD/只家兔	<1	1	4/4 保护
	320MLD/只家兔	<1	1	4/4 保护
	160MLD/只家兔	<1	1	4/4 保护
商品苗	100MLD/只家兔	<1	1	4/4 保护
对照		<1	<1	2/2 死亡

[0153] 实施例4、本发明方法与传统工艺比较

[0155] 按照表9中传统工艺中所采用的肉肝胃酶消化汤制备方法,制备得到肉肝胃酶消化汤。利用肉肝胃酶消化汤制备传统疫苗。传统疫苗制备方法详见《中国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版101-102页。

[0156] 将本发明的方法与传统工艺进行比较,本发明方法稳定性更好、耗时更短、成本更低,尤其是免疫效果得到极显著增强,血清效价成本比更是获得极大幅度的提高,详细结果如表7-10所示。

[0157] 表7为本发明方法与传统工艺相关参数比较

项目	本发明方法	传统工艺 (用肉肝胃酶消 化汤)	本发明方法/ 传统工艺	备注
[0158] 重复性及稳定性	好	差		受限于牛肉、牛肝的品质，传统工艺稳定性差，常有产
				毒结果不合格的情况出现
[0159] 耗时	配制 5 小时	配制 28 小时	0.18	
每 10000 毫升培养基成本	758.9 元	肉肝胃酶消化汤 2051.5 元	0.37	尚未将传统工艺产毒不合格率(约 30%)列入考虑，否则传统工艺成本更高。
一免血清效价	4	<1	>4	
每头份疫苗性价比(一免血清效价/该组分成本)	65.88	<1.35	>48.8	
二免血清效价	50	1	50	
每头份疫苗性价比(二免血清效价/该组分成本)	823.5	0.677	1216.4	

[0160] 表8为本发明方法成本核算

项目	名称	计算方法	每 10000 毫升成本(元)	备注	单价
[0161]	酪蛋白胨	90/250*300	108		90 元/250g 奥博星
	酵母浸粉	55/250*150	33		55 元/250g 奥博星
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	109/500*0.0014	0.0003		109 元/500g BBI
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	45/500*50	4.5		45 元/500g 奥博星
	KH ₂ PO ₄	40/500*5	0.4		40 元/500g 奥博星
	葡萄糖	20/500*100	4		20 元/500g 奥博星
	L-赖氨酸	225/500*70	31.5	原材料总计 181.4 元	225 元/500g 酷尔试剂
人工费用		200/8*11*2	550	配液 2 小时, 分装及高压灭菌 3 小时。配制需 5 小时, 培养需 6 小时, 共需 11 小时。按两个人工, 每日 (8	
				小时) 200 元投入计算。	
[0162]	仪器折旧、燃料动力	20/8*11	27.5	按每天 20 元计算	
	合计		758.9		

[0163] 表9为传统工艺(肉肝胃酶消化汤)的成本核算

[0164]

项目	名称	计算方法	每 10000 毫升成 本(元)	备注	单价
原材料 成本	牛肉	59.9/1000*2000*1.2	143.76	按需去除脂肪和筋膜,故 按 20%富余进行计算	59.9 元/kg (京 东)
	牛肝	49/5000*500*1.2	5.88	按需去除脂肪和筋膜,故 按 20%富余进行计算	49 元/5kg(京东)
	胃蛋白酶 (1: 3000)	658/500*35	46.06		658 元/500g BBI
	盐酸	10/500*105	2.1		10 元/500ml
	蛋白胨	30/250*100	12		30 元/250g 奥 博星
	糊精	21/500*100	4.2		21 元/500g 奥 博星
人工费 用		200/8*35*2	1750	剔除肉上的脂肪、筋膜并 绞肉需 1 小时,消化需 24 小时,配液 2 小时,分装 及高压灭菌 3 小时。配制 需 30 小时,培养需 5 小 时,共需 35 小时。按两 个人工,每日(8 小时) 200 元投入计算。	
仪器折		20/8*35	87.5	按每天 20 元计算	

[0165]

旧、燃料 动力					
总计			2051.5		

[0166]

表10为传统工艺使用的厌气肉肝胃酶消化汤组成

[0167]

牛肉	200g
肝(牛、羊、猪)	50g
胃蛋白酶(1:3000)	3~4g
盐酸	10~11ml
蛋白胨	10g
葡萄糖	10g

蒸馏水加至	1000ml
-------	--------

[0168] 传统工艺使用的厌气肉肝胃酶消化汤的制法：

[0169] 1、在65℃左右温水内加入盐酸和绞碎的牛肉、肝，充分搅匀，再加入胃蛋白酶充分搅拌，混合后的温度应在56~58℃。

[0170] 2、置53~55℃消化22~24小时。前10小时每小时充分搅拌1次。

[0171] 3、提取上清液，加热至80℃，然后加入蛋白胨煮开，调pH 7.6~7.8。煮沸10分钟，滤过或经沉淀后取上清液，按量加入葡萄糖溶解后分装。

[0172] 4、116℃灭菌40分钟。

1 2 3 4 M



图1