

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03144275.7

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C07K 14/26 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年6月6日

[11] 授权公告号 CN 1320104C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 30/00 (2006.01)
C12R 1/22 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

[22] 申请日 2003.9.15 [21] 申请号 03144275.7

[73] 专利权人 天津医科大学

地址 300070 天津市和平区气象台路 22
号天津医科大学

[72] 发明人 陈锦英

[56] 参考文献

CN1348007A 2002.5.8

US4870053A 1989.9.26

审查员 冯 怡

[74] 专利代理机构 天津市学苑有限责任专利代理
事务所

代理人 李 明 丛莉珍

权利要求书 2 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂的菌株
及其筛选和应用

[57] 摘要

一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂的菌株及其筛选和应用, 属于一株肺炎克雷伯氏菌及筛选方法, 以及利用该菌制备荚膜糖蛋白的方法。本发明解决了目前制备的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白出发菌不具有国内肺炎克雷伯氏菌感染的流行株的特征及产品价格昂贵等问题。其技术方案是利用现代生物技术, 通过菌株筛选、培养、裂解等工序进行荚膜糖蛋白的粗提并进一步纯化, 制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白免疫调节剂, 从而克服了抗生素用于治疗感染存在耐药性问题; 弥补了细胞因子作为免疫调节剂价格昂贵、半衰期短、超生理剂量给药副作用大的不足。本发明为人类增强机体免疫力, 抵抗病原微生物的感染提供了一条有效途径, 具有重大的经济效益和社会效益。

1. 一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂的菌株，其特征在于所述的菌株经法国生物—梅里埃 VITEK-AMS 系统鉴定是肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*, Kp) Kp-9 株，保藏号 CGMCC No. 1000，保藏单位是中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，该菌株是从国内临床标本分离的肺炎克雷伯氏菌中筛选而来，同国外菌株比较，具有中国肺炎克雷伯氏菌感染流行株的特征。

2. 权利要求 1 所述的一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂的菌株的应用，其特征是：以肺炎克雷伯氏菌 CGMCC No. 1000 为原料，经培养、裂解工序进行荚膜糖蛋白的粗提和纯化，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白；可作为免疫调节剂，增强机体的免疫力。

3. 权利要求 2 所述的一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂菌株的应用，其特征是应用肺炎克雷伯氏菌 CGMCC No. 1000 制备肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白，具体包括以下步骤：

(一) 菌种的培养：

培养工艺：菌种→液体培养→小鼠体内传代→平板分离→液体培养至收获；

其中：· 菌种的保藏，采用冷冻干燥或斜面低温保存菌种；

· 斜面保存和平板分离使用 LB 固体培养基；液体培养基为适合该菌生长的含蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、葡萄糖、无机盐的营养培养基；

(二) 肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白的粗提：

· 培养物裂解：向上述肺炎克雷伯氏菌 CGMCC No. 1000 培养物中加入溶菌酶、防腐剂叠氮钠或硫柳汞钠盐，以及表面活性剂，先 50~60℃ 作用 1~2 小时，再升温至 35℃~40℃ 作用 5~10 天；其中加入溶菌酶终浓度为 100~400 μg/mL、防腐剂叠氮钠或硫柳汞钠盐至终浓度 0.01%~0.1%(W/V)、表面活性剂至终浓度为 0.5%~5%(V/V)；

· 分离浓缩：经裂解处理的肺炎克雷伯氏菌培养物离心去沉淀，上清部分旋转蒸发，得到棕色液体；

· 去脂：向浓缩的液体中加入 2~5 倍体积有机溶剂甲醇、乙醇、三氯醋酸或甲缩醛中的一至两种沉淀荚膜糖蛋白，室温搅拌 10~60 分钟，有深棕色沉淀生成，静止 10~30 分钟，过滤去上清，干燥，沉淀物经有机溶剂乙醇、丙酮、乙醚或石油醚，洗涤后置于索氏提取器中，再用有机溶剂丙酮、乙醚或石油醚，抽提去除脂肪；

· 去蛋白：物理方法，即将去脂后的固体物质溶于 1~4 倍重量水中，4℃~7℃ 放置 48~72 小时，或调 pH 至 5~6，加热，有变性的蛋白复合物和结晶的无机盐析出，5000~10000rpm 离心 30~60 分钟，留取上清；化学方法，即加入无机盐硫酸铵、硫酸钠或磷酸钠，或有机溶剂甲醇、乙醇、丙酮或甲缩醛中的一至两种，5000~10000rpm 离心 30~60 分钟，留取上清；

· 糖蛋白沉淀：上清加入 2~5 倍体积有机溶剂甲醇、乙醇、三氯醋酸或甲缩醛中的一至两种，搅拌 10~60 分钟，获得黄色沉淀，迅速用有机溶剂乙醇、

丙酮、乙醚或石油醚，洗涤，干燥，研磨，得到肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白粗品；

(三) 糖蛋白的纯化和检测：

• 采用制备型反向色谱法或凝胶过滤色谱法两种色谱层析分离技术对荚膜糖蛋白粗品进行纯化：采用制备型反向色谱法时，色谱柱采用 C_{18} 反向制备柱，流动相为以水+三氟乙酸 TFE，采用梯度洗脱方式，紫外 280nm 检测，收集样品，经过真空冷冻干燥，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品；采用凝胶过滤色谱法时，采用 TSK 凝胶色谱柱，PBS 流动相，恒定洗脱，紫外 280nm 检测，收集样品，经过真空冷冻干燥，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品。

• 对制备的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白终产物进行检测：采用 HPLC 反向色谱法或凝胶过滤色谱法测定分子量；Lowery 法测定蛋白含量；DNS 法测定总糖含量；咔唑法测定葡萄糖醛酸含量；应用 ConA 体外刺激淋巴细胞增殖实验和溶血空斑实验（PFC，微量单层细胞法）检测产物对体液免疫和细胞免疫的调节作用，终产物分子量为 55~65kD，纯度 93%~97%，蛋白含量 25%~40%，总糖含量 20%~30%，葡萄糖醛酸 3~5%，对 T 细胞和 B 细胞均有明显的刺激作用。

4. 按照权利要求 3 所述的一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂菌株的应用，其特征是培养物裂解时加入温和的表面活性剂选自 NP40、Brij58、Triton X-100。

5. 按照权利要求 3 所述的一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂菌株的应用，其特征是分离浓缩旋转蒸发时，温度 $<70^{\circ}\text{C}$ ，浓缩至六分之一体积。

6. 按照权利要求 3 所述的一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂菌株的应用，其特征是制备型反向色谱法纯化时色谱柱采用 $25\times 100\text{cm}$ 规格的 C_{18} 反向制备柱；流动相为以水+0.1%~0.2%三氟乙酸 TFE， $\text{pH}=3.0\sim 6.0$ ；加样量 100~200mg，即 20~30 mg/mL；采用梯度洗脱方式，流速 2~5 mL/min；收集峰保留时间在 1~15 min 的样品。

7. 按照权利要求 3 所述的一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂菌株的应用，其特征是凝胶过滤色谱法纯化时采用 $7.5\text{mm}\times 30\text{cm}$ 规格的 TSKgel 色谱柱；流动相为 0.1~0.2mol/L 的含叠氮钠 0.02%的 PBS， $\text{pH}=6.0\sim 9.0$ ；流速 1~3 mL/min，恒定洗脱；收集峰保留时间在 1~15 min 的样品。

一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂的菌株及其筛选和应用

技术领域

本发明属于菌种筛选及细菌活性成分制备的技术领域，特别涉及一种产高效荚膜糖蛋白的肺炎克雷伯氏菌及其筛选方法，以及利用该菌株制备荚膜糖蛋白的方法。

背景技术

目前，免疫调节剂的研究是一个热点课题，其中细胞因子是近年来在免疫学中的一个非常活跃的研究领域，许多因子如：IL-2，GM-CSF，TNF- α 等经临床证实均具有较好的调节作用，但细胞因子作为免疫调节剂存在以下问题：

- 1) 需要采用基因重组技术合成，价格较为昂贵；
- 2) 半衰期短，在体内存留时间短，因此药效持续时间短；
- 3) 超生理剂量给药毒副作用大。

所以临床上基本用于肿瘤的治疗，而少用于感染。

在免疫调节剂一族中，细菌的表面组分用来增强机体的非特异性免疫力，以防治感染，愈来愈受到人们的重视，它们主要是细菌细胞壁成分，如葡萄球菌、乳杆菌、双歧杆菌的肽聚糖，红色奴卡菌的细胞壁骨架以及链球菌的脂磷壁酸等，荚膜也用于感染的防治，它从针对特异性感染的预防到作为免疫调节剂提高机体免疫力都发挥着作用，其中，肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*, Kp) 以其丰厚的荚膜在革兰氏阴性杆菌中著称，成为研究的热点。大量实验证明，肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白是一种理想的免疫调节剂，它具有刺激作用强、副作用小的特点，对细菌（绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯氏菌、伤寒沙门氏菌、李斯特氏菌）、病毒（流感病毒、引起脑和心肌炎病变的病毒）、真菌（白假丝酵母菌）等引起的感染具有明显的作用。多项实验表明，它是通过增强体液免疫和细胞免疫、刺激 M Φ 和 T 细胞释放大量细胞因子增强机体的免疫机能从而达到抗细菌、病毒以及真菌感染的作用。美国专利 No. 4596709、No. 3939994 公开了从肺炎克雷伯氏菌中提取免疫糖蛋白的方法，但该方法存在以下问题：

1) 现有方法没有关于肺炎克雷伯氏菌筛选方法的报道，而实验证明，菌株筛选对提高产量和产品的免疫活性有重要影响；

2) 现有方法制备肺炎克雷伯氏菌糖蛋白时，采用的出发菌株不具有国内肺炎克雷伯氏菌感染流行株的特征；

3) 现有制备方法工艺复杂，比如对粗提物进行纯化时涉及到多步膜分离和柱色谱技术，需要庞大的设备支持，制备成本高，产品价格昂贵。

所以研制开发操作方便，工艺和设备简单、成本低、利于工业化生产并具有中国肺炎克雷伯氏菌感染流行株的特征的肺炎克雷伯氏菌糖蛋白是当务之

急。

发明内容

针对上述情况，结合现代生物技术，本发明克服现有技术的不足，解决了当前肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白生产菌株不具有中国肺炎克雷伯氏菌感染流行株的特征的问题，使该免疫调节类物质更适合国内感染人群，提供一株产高效荚膜糖蛋白的肺炎克雷伯氏菌 Kp-9，以及肺炎克雷伯氏菌株筛选方法和荚膜糖蛋白的新型制备方法。

技术方案：

一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂的菌株，经法国生物—梅里埃 VITEK-AMS 系统鉴定是肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*, Kp) Kp-9 株，保藏号 CGMCC No. 1000，保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，该菌株为从国内临床标本分离的肺炎克雷伯氏菌中筛选而来，同国外菌株比较，具有中国肺炎克雷伯氏菌感染流行株的特征。

其筛选方法是：

- 菌源选择：选用国内临床分离的肺炎克雷伯氏菌株和肺炎克雷伯氏菌标准菌株 46114 作为菌源，进行筛选比较；

- 肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白抗血清的制备：以 1~10mg/mL 肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白为免疫原，0.1~0.5mL/只的剂量免疫无基础交叉抗体的雄性大白兔，后对免疫白兔采血，3000~5000rpm 离心 15~30 分钟获得免疫血清；

- 筛选方案：将菌体培养物悬于酶联免疫吸附实验包被液，浊度达到 $10^5 \sim 10^{10}$ CFU/mL，以此菌悬液包被酶标板，每孔 100 μ L，30~37℃ 放置 2~4 小时，后于 4℃ 放置 10~15 小时，一抗为上述制备的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白免疫血清，二抗为辣根过氧化物酶结合的抗体，以同样处理的大肠杆菌 K-12 为阴性对照，采用酶联免疫吸附实验对临床分离的菌株进行筛选，选择免疫活性高的菌株进行后续实验。

应用本发明提供的肺炎克雷伯氏菌株 Kp-9 制备荚膜糖蛋白的方法是：以该菌株为原料，经培养、裂解等工序进行荚膜糖蛋白的粗提和纯化，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白；可作为免疫调节剂，增强机体的免疫力；具体包括以下步骤：

(一) 菌种的培养：

培养工艺：菌种 → 液体培养 → 小鼠体内传代 → 平板分离 → 液体培养至收获；

其中：• 菌种的保藏，采用冷冻干燥或斜面低温保存菌种；

- 斜面保存和平板分离使用 LB 固体培养基；液体培养基为适合该菌生长的含蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、葡萄糖、无机盐的营养培养基；

(二) 肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白的粗提：

- 培养物裂解：向上述肺炎克雷伯氏菌培养物中加入溶菌酶、防腐剂叠氮钠或硫柳汞钠盐，以及表面活性剂，先 50~60℃ 作用 1~2 小时，再升温至 35℃~40℃ 作用 5~10 天；其中加入溶菌酶终浓度为 100~400 μ g/mL、防腐剂叠氮钠或硫柳汞钠盐至终浓度 0.01%~0.1% (W/V)、表面活性剂至终浓度为 0.5%~

5%(V/V);

• 分离浓缩: 经裂解处理的肺炎克雷伯氏菌培养物离心去沉淀, 上清部分旋转蒸发, 得到棕色液体;

• 去脂: 向浓缩的液体中加入 2~5 倍体积有机溶剂, 如甲醇、乙醇、三氯醋酸或甲缩醛中的一至两种沉淀荚膜糖蛋白, 室温搅拌 10~60 分钟, 有深棕色沉淀生成, 静止 10~30 分钟, 过滤去上清, 干燥, 沉淀物经有机溶剂, 如乙醇、丙酮、乙醚或石油醚, 洗涤后置于索氏提取器中, 再用有机溶剂, 如丙酮、乙醚或石油醚, 抽提去除脂肪;

• 去蛋白: 物理方法, 即将去脂后的固体物质溶于 1~4 倍重量水中, 4℃~7℃放置 48~72 小时, 或调 pH 至 5~6, 加热, 有变性的蛋白复合物和结晶的无机盐析出, 5000~10000rpm 离心 30~60 分钟, 留取上清; 化学方法, 即加入无机盐如硫酸铵、硫酸钠或磷酸钠, 或有机溶剂如甲醇、乙醇、丙酮或甲缩醛中的一至两种, 5000~10000rpm 离心 30~60 分钟, 留取上清;

• 糖蛋白沉淀: 上清加入 2~5 倍体积有机溶剂, 如甲醇、乙醇、三氯醋酸或甲缩醛中的一至两种, 搅拌 10~60 分钟, 获得黄色沉淀, 迅速用有机溶剂, 如乙醇、丙酮、乙醚或石油醚, 洗涤, 干燥, 研磨, 得到肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白粗品;

(三) 糖蛋白的纯化和检测:

• 采用制备型反向色谱法或凝胶过滤色谱法两种色谱层析分离技术对荚膜糖蛋白粗品进行纯化: 采用制备型反向色谱法时, 色谱柱采用 C_{18} 反向制备柱或, 流动相为以水+三氟乙酸 TFE, 采用梯度洗脱方式, 紫外 280nm 检测, 收集样品, 经过真空冷冻干燥, 制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品; 采用凝胶过滤色谱法时, 采用 TSK 凝胶过滤色谱柱, PBS 流动相, 恒定洗脱, 紫外 280nm 检测, 收集样品, 经过真空冷冻干燥, 制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品。

• 对制备的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白终产物进行检测: 采用 HPLC 反向色谱法或凝胶过滤色谱法测定分子量; Lowery 法测定蛋白含量; DNS 法测定总糖含量; 咔唑法测定葡萄糖醛酸含量; 应用 ConA 体外刺激淋巴细胞增殖实验和溶血空斑实验 (PFC, 微量单层细胞法) 检测产物的对体液免疫和细胞免疫的调节作用, 终产物分子量为 55~65kD, 纯度 93%~97%, 蛋白含量 25%~40%, 总糖含量 20%~30%, 葡萄糖醛酸 3~5%, 对 T 细胞和 B 细胞均有明显的刺激作用。

需要说明的是:

培养物裂解时加入表面活性剂如 NP40、Brij58、Triton X-100。

分离浓缩旋转蒸发时, 温度 $<70^{\circ}\text{C}$, 浓缩至六分之一体积。

制备型反向色谱法纯化时色谱柱采用 25×100cm 规格的 C_{18} 反向制备柱; 流动相为以水+0.1%~0.2%三氟乙酸 TFE, pH=3.0~6.0; 加样量 100~200mg, 即 20~30 mg/mL; 采用梯度洗脱方式, 流速 2~5 mL/min; 收集峰保留时间在 1~15 min 的样品。

在肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白的制备中, 凝胶过滤色谱法纯化时采用 7.5mm×30 cm 规格的 TSK 凝胶过滤色谱柱; 流动相为 0.1~0.2mol/L 的含叠氮

钠 0.02%的 PBS, pH=6.0~9.0; 流速 1~3 mL/min, 恒定洗脱; 收集峰保留时间在 1~15 min 的样品。

有益效果:

本发明应用现代生物技术, 筛选出一株产高效荚膜糖蛋白的肺炎克雷伯氏菌 Kp-9, 提供了新型的肺炎克雷伯氏菌株筛选方法和荚膜糖蛋白制备方法。该菌株具有国内肺炎克雷伯氏菌感染流行株的特征, 并且荚膜糖蛋白产量和活性都高于供筛的其它菌株。应用用该菌生产免疫调节剂的工艺, 是从微生物中提取活性物质, 避免了从动物体内提取活性物质的不安全性和从植物细胞提取的高成本; 其所得产品属于细菌表面活性成分, 能增强机体免疫力, 不具有耐药性问题, 用做免疫调节类药物。它克服了病原体易对抗生素类药物产生耐药性的弊端, 弥补了细胞因子作为免疫调节剂存在的价格昂贵、半衰期短、超生理剂量给药毒副作用大的不足, 适用于感染性疾病的防治。

和同类现有产品及其生产工艺相比, 本发明充分考虑出发菌种对终产品的重要影响, 建立了特异性强的菌株筛选方法, 对临床分离菌株和标准菌株进行比较分析, 筛选出高活性、高产荚膜糖蛋白的菌株, 对最终产量的提高起到重要作用; 在制备过程中, 采用温和的提取条件, 避免了因提取条件激烈而导致的糖蛋白变性失活, 制备的终产品免疫活性高; 通过纯化, 获得了高纯度的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白, 提供了一种有效的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白制备方法, 克服了现有技术工艺复杂、成本昂贵的缺点, 为此类免疫调节剂的生产、应用奠定基础。本发明的主要优点如下:

- 1、提供了一株产高活性荚膜糖蛋白的肺炎克雷伯氏菌菌株, 该菌株具有国内肺炎克雷伯氏菌感染流行株的特征, 弥补现有产品在该方面的不足;
- 2、本发明建立的肺炎克雷伯氏菌株筛选方法具有特异性强、精确度高、取样量少、步骤简捷、容易操作等优点, 可以进行微量、大批样品的测定;
- 3、应用本发明方法筛选的肺炎克雷伯氏菌株对体液免疫和细胞免疫的调节作用明显强于同时检测的标准菌株和其它菌株, 终产量也高于其它菌株;
- 4、发酵液裂解、提取工艺操作条件温和, 同现有技术比较, 产品免疫活性提高;
- 5、采用现代生物技术对粗提物进行纯化, 操作方便, 工艺和设备简单, 产品纯度高;
- 6、制备工艺简单易行, 利于工业化生产;
- 7、生产投资少、成本低、见效快、效益高;
- 8、本发明制备的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白具有免疫调节作用, 能增强机体免疫力, 不具有耐药性问题, 克服病原体易对抗生素类药物产生耐药性的弊端, 适用于感染性疾病的防治。

本发明为人类增强机体免疫力, 抵抗病原微生物的感染提供了一条有效途径, 应用前景广阔, 具有重大的经济效益和社会效益。

菌种保藏情况:

菌种保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

菌种保藏号：CGMCC No. 1000

菌种保藏日期：2003年9月8日

具体实施方式：

实施例 1：一种产高效荚膜糖蛋白的肺炎克雷伯氏菌筛选方法。它包括以下步骤：

（一）菌源选择：选用国内临床分离的肺炎克雷伯氏菌株和肺炎克雷伯氏菌标准菌株 46114 作为菌源，进行筛选比较。

（二）肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白抗血清的制备：以 5mg/mL 肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白为免疫原，0.3mL/只的剂量免疫无基础交叉抗体的雄性大耳白兔，后对免疫白兔采血，4000rpm 离心 20 分钟获得免疫血清。

（三）筛选方案：将菌体培养物悬于酶联免疫吸附实验包被液（浊度达到 10^7 CFU/mL），以此菌悬液包被酶标板，每孔 100 μ L，35 $^{\circ}$ C 放置 3 小时，后于 4 $^{\circ}$ C 放置 12 小时，一抗为上述制备的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白免疫血清，二抗为辣根过氧化物酶结合的抗体，以同样处理的大肠杆菌 K-12 为阴性对照，采用酶联免疫吸附实验对临床分离的菌株进行筛选，选择免疫活性高的菌株为筛选菌株。

实施例 2：一种产高效荚膜糖蛋白的肺炎克雷伯氏菌筛选方法。它包括以下步骤：

（一）菌源选择：选用国内临床分离的肺炎克雷伯氏菌株和肺炎克雷伯氏菌标准菌株 46114 作为菌源，进行筛选比较；

（二）肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白抗血清的制备：以 1mg/mL 肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白为免疫原，0.1mL/只的剂量免疫无基础交叉抗体的雄性大耳白兔，后对免疫白兔采血，3000rpm 离心 20 分钟获得免疫血清；

（三）筛选方案：将菌体培养物悬于酶联免疫吸附实验包被液（浊度达到 10^5 CFU/mL），以此菌悬液包被酶标板，每孔 100 μ L，30 $^{\circ}$ C 放置 2 小时，后于 4 $^{\circ}$ C 放置 10 小时，一抗为上述制备的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白免疫血清，二抗为辣根过氧化物酶结合的抗体，以同样处理的大肠杆菌 K-12 为阴性对照，采用酶联免疫吸附实验对临床分离的菌株进行筛选，选择免疫活性高的菌株为筛选菌株；

实施例 3：一种产高效荚膜糖蛋白的肺炎克雷伯氏菌筛选方法。它包括以下步骤：

（一）菌源选择：选用国内临床分离的肺炎克雷伯氏菌株和肺炎克雷伯氏菌标准菌株 46114 作为菌源，进行筛选比较；

（二）肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白抗血清的制备：以 10mg/mL 肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白为免疫原，0.5mL/只的剂量免疫无基础交叉抗体的雄性大耳白兔，后对免疫白兔采血，5000rpm 离心 20 分钟获得免疫血清；

（三）筛选方案：将菌体培养物悬于酶联免疫吸附实验包被液（浊度达到

10⁶CFU/mL)，以此菌悬液包被酶标板，每孔 100 μL，40℃放置 4 小时，后于 4℃放置 15 小时，一抗为上述制备的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白免疫血清，二抗为辣根过氧化物酶结合的抗体，以同样处理的大肠杆菌 K-12 为阴性对照，采用酶联免疫吸附实验对临床分离的菌株进行筛选，选择免疫活性高的菌株为筛选菌株；

应用实验 1:

一种肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白的制备方法，它包括以下步骤：

(一) 菌种的培养

采用肺炎克雷伯菌 Kp-9 株；

培养工艺：菌种→液体培养→小鼠体内传代→平板分离→液体培养至收获；

其中：

- 菌种的保藏，采用冷冻干燥；
- 斜面保存和平板分离使用 LB 固体培养基；液体培养基为适合该菌生长的含蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、葡萄糖、无机盐的营养培养基；

(二) 荚膜糖蛋白粗提

• 培养物裂解：取上述肺炎克雷伯氏菌培养物 1.2L，加入溶菌酶 240mg，终浓度为 200 μg/mL，先 55℃作用 1.5 小时，然后加入硫柳汞钠盐 0.6g 至终浓度 0.05% (W/V)、NP40 36mL，35℃作用 7 天；

• 分离浓缩：经裂解处理的肺炎克雷伯氏菌培养物离心去沉淀，上清部分旋转蒸发，温度<70℃，浓缩至 200 mL（六分之一体积），得到棕色液体；

• 去脂：向浓缩的液体中加入 600 mL（3 倍体积）甲醇和甲缩醛混合液，甲醇：甲缩醛为 1：3，室温搅拌 30 分钟，有深棕色沉淀生成，静止 20 分钟，过滤去上清，干燥，沉淀物经丙酮洗涤后置于索氏提取器中，再用丙酮抽提去除脂肪；

• 去蛋白：将去脂后的固体物质溶于 3 倍重量的水中，4℃放置 60 小时，有变性的蛋白复合物和结晶的无机盐析出，8000rpm 离心 40 分钟，留取上清；

• 糖蛋白沉淀：上清加入 3 倍体积的甲醇和甲缩醛混合液，甲醇：甲缩醛为 1：3，搅拌 30 分钟，获得黄色沉淀，迅速用丙酮洗涤，干燥，研磨，得到肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白粗品；

(三) 糖蛋白的纯化和检测

采用 waters 反向制备系统，工艺条件为 C₁₈ 反向制备柱（25×100cm），以水+0.15%三氟乙酸 TFE（pH=4.0）为流动相，加样量 150mg（25 mg/mL），采用梯度洗脱方式，流速 3 mL/min，紫外 280nm 检测，收集峰保留时间在 1~15 min 的样品，经过真空冷冻干燥，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品。

应用 HPLC 凝胶过滤色谱法测定分子量，Lowery 法测定蛋白含量，DNS 法测定总糖含量，咔唑法测定葡萄糖醛酸含量，应用 ConA 体外刺激淋巴细胞增殖实验和溶血空斑实验（PFC，微量单层细胞法）检测产物的免疫学活性。

对比实验:

A. 以肺炎克雷伯氏菌标准菌株 46114 作为菌源, 按上述方法制备荚膜糖蛋白;

B. 以实施例 1 筛选过程中落选的肺炎克雷伯氏菌 Kp-15 株作为菌源, 按上述方法制备荚膜糖蛋白;

C. 以本发明的肺炎克雷伯氏菌 Kp-9 株为菌源, 按美国专利 No. 4596709 公开了的方法制备荚膜糖蛋白;

D. 以本发明的肺炎克雷伯氏菌 Kp-9 株为菌源, 按美国专利 No. 3939994 公开了的方法制备荚膜糖蛋白。

结果显示:

A. 应用本发明筛选的菌株制备荚膜糖蛋白, 同以肺炎克雷伯氏菌标准菌株 46114 以及实施例 1 筛选过程中落选的肺炎克雷伯氏菌 Kp-15 株作为菌源制备的荚膜糖蛋白相比, 对 T 细胞和 B 细胞的刺激作用强, 产量高;

B. 按本发明所提供的荚膜糖蛋白制备方法比按美国专利 No. 4596709、No. 3939994 公开了的方法制备的荚膜糖蛋白对 T 细胞和 B 细胞的刺激作用强, 产量也高。

应用实验 2:

一种肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白的制备方法, 它包括以下步骤:

(一) 菌种的培养

采用斜面低温保存菌株 Kp-9。斜面保存和平板分离使用 LB 固体培养基, 液体培养基为适合该菌生长的含蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、葡萄糖、无机盐的营养培养基。

菌种的培养工序: 菌种→液体培养→小鼠体内传代→平板分离→液体培养至收获;

(二) 荚膜糖蛋白的粗提

• 培养物裂解: 取上述肺炎克雷伯氏菌培养物 1.2L, 加入溶菌酶 120 mg 至终浓度 100 μ g/mL, 60 $^{\circ}$ C 作用 1 小时, 然后加入硫柳汞钠盐 0.12g 至终浓度 0.01% (W/V)、Triton X-100 60mL, 30 $^{\circ}$ C 作用 10 天;

• 分离浓缩: 经裂解处理的肺炎克雷伯氏菌培养物离心去沉淀, 上清部分旋转蒸发, 温度<70 $^{\circ}$ C, 浓缩至 200 mL(六分之一体积), 得到棕色液体;

• 去脂: 向浓缩的液体中加入 400 mL (2 倍体积) 的甲醇和甲缩醛混合液 (甲醇:甲缩醛为 1:5), 室温搅拌 1 小时, 有深棕色沉淀生成, 静止 30 分钟, 过滤去上清, 干燥, 沉淀物经丙酮洗涤后置于索氏提取器中, 用丙酮抽提去除脂肪;

• 去蛋白: 将去脂后的固体物质溶于 4 倍重量的水中, 4 $^{\circ}$ C 放置 48 小时, 有变性的蛋白复合物和结晶的无机盐析出, 10000rpm 离心 30 分钟, 留取上清;

• 糖蛋白沉淀: 上清加入 2 倍体积的甲醇和甲缩醛混合液 (甲醇:甲缩醛为

1: 5), 搅拌 1 小时, 获得黄色沉淀, 迅速用丙酮洗涤, 干燥, 研磨, 得到肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白粗品;

(三) 糖蛋白的纯化和检测

采用 waters 反向制备系统, 工艺条件为 C_{18} 反向制备柱 (25×100cm), 以水+0.1%三氟乙酸 TFE (pH=6.0) 为流动相, 加样量 100mg (20 mg/mL), 采用梯度洗脱方式, 流速 2 mL/min, 紫外 280nm 检测, 收集峰保留时间在 1~15 min 的样品, 经过真空冷冻干燥, 制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品。

应用 HPLC 凝胶过滤色谱法测定分子量, Lowery 法测定蛋白含量, DNS 法测定总糖含量, 吡唑法测定葡萄糖醛酸含量, 应用 ConA 体外刺激淋巴细胞增殖实验和溶血空斑实验 (PFC, 微量单层细胞法) 检测产物的免疫学活性。

对比实验:

培养物裂解时, 采用表面活性剂 Tween80 60 mL (该表面活性剂为现有技术所用) 至终浓度 5%辅助溶菌酶作用, 其它步骤同上。

结果显示, 应用本发明的所采用的表面活性剂比用 Tween80 制备的荚膜糖蛋白对 T 细胞和 B 细胞的刺激作用强, 产量高。

应用实验 3:

一种肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白的制备方法, 它包括以下步骤:

(一) 菌种的培养

采用斜面低温保存菌株 Kp-9;

培养基: 斜面保存和平板分离使用 LB 固体培养基, 液体培养基为适合该菌生长的含蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、葡萄糖、无机盐的营养培养基;

菌种的培养: 菌种→液体培养→小鼠体内传代→平板分离→液体培养至收获;

(二) 荚膜糖蛋白的粗提

• 培养物裂解: 取上述肺炎克雷伯氏菌培养物 1.2L, 加入溶菌酶 480mg 至终浓度 400 μ g/mL, 50°C作用 2 小时, 然后加入叠氮钠 1.2g 至终浓度 0.1% (W/V)、NP40 6mL, 40°C作用 5 天;

• 分离浓缩: 经裂解处理的肺炎克雷伯氏菌培养物离心去沉淀, 上清部分旋转蒸发, 温度<70°C, 浓缩至 200ml (六分之一体积), 得到棕色液体;

• 去脂: 向浓缩的液体中加入 1000mL (5 倍体积) 甲醇和甲缩醛混合液 (甲醇:甲缩醛为 1: 2), 室温搅拌 10 分钟, 有深棕色沉淀生成, 静止 10 分钟, 过滤去上清, 干燥, 沉淀物经丙酮洗涤后置于索氏提取器中, 用丙酮抽提去除脂肪;

• 去蛋白: 将去脂后的固体物质溶于 5 倍重量的水中, 7°C放置 72 小时, 有变性的蛋白复合物和结晶的无机盐析出, 5000rpm 离心 60 分钟, 留取上清;

• 糖蛋白沉淀: 上清加入 5 倍体积甲醇和甲缩醛混合液 (甲醇:甲缩醛为 1:2), 搅拌 10 分钟, 获得黄色沉淀, 迅速用丙酮洗涤, 干燥, 研磨, 得到肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白粗品;

（三）糖蛋白的纯化和检测

采用 waters 反向制备系统，工艺条件为 C_{18} 反向制备柱（ $25 \times 100 \text{cm}$ ），以水+0.2%三氟乙酸 TFE（ $\text{pH}=3.0$ ）为流动相，加样量 200mg（30 mg/mL），采用梯度洗脱方式，流速 5 mL/min，紫外 280nm 检测，收集峰保留时间在 1~15 min 的样品，经过真空冷冻干燥，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品。

应用 HPLC 凝胶过滤色谱法测定分子量，Lowery 法测定蛋白含量，DNS 法测定总糖含量，咔唑法测定葡萄糖醛酸含量，应用 ConA 体外刺激淋巴细胞增殖实验和溶血空斑实验（PFC，微量单层细胞法）检测产物的免疫学活性。

应用实验 4:

一种肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白的制备方法，它包括以下步骤：

（一）菌种的培养

菌种的保藏：斜面低温保存菌株 Kp-9；

培养基：斜面保存和平板分离使用 LB 固体培养基，液体培养基为适合该菌生长的含蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、葡萄糖、无机盐的营养培养基；

菌种的培养：菌种→液体培养→小鼠体内传代→平板分离→液体培养至收获；

（二）荚膜糖蛋白的粗提

• 培养物裂解：取上述肺炎克雷伯氏菌培养物 1.2L，加入溶菌酶 240mg， 50°C 作用 1.5 小时，然后加入硫柳汞钠盐 0.6g, Brij58 至终浓度 12mL， 35°C 作用 7 天；

• 分离浓缩：经裂解处理的肺炎克雷伯氏菌培养物离心去沉淀，上清部分旋转蒸发，温度 $<70^\circ\text{C}$ ，浓缩至 200mL，得到棕色液体；

• 去脂：向浓缩的液体中加入 600mL 乙醇，室温搅拌 30 分钟，有浅棕色沉淀生成，静止 30 分钟，过滤去上清，干燥，沉淀物经丙酮洗涤后置于索氏提取器中，用丙酮抽提去除脂肪；

• 去蛋白：将去脂后的固体物质溶于 3 倍重量的水中， 4°C 放置 60 小时，有变性的蛋白复合物和结晶的无机盐析出，8000rpm 离心 40 分钟，留取上清；

• 糖蛋白沉淀：上清加入 3 倍体积乙醇，搅拌 30 分钟，获得浅黄色沉淀，迅速用丙酮洗涤，干燥，研磨，得到肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白粗品；

（三）糖蛋白的纯化和检测：

采用凝胶过滤色谱法纯化，工艺条件为采用 $7.5 \text{mm} \times 30 \text{cm}$ 规格的 TSKgel G4000SW 色谱柱；流动相为 0.1mol/L 的含叠氮钠 0.02% 的 PBS， $\text{pH}=6.0$ ；流速 1 mL/min，恒定洗脱；收集峰保留时间在 1~15 min 的样品，经过真空冷冻干燥，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品。

应用 HPLC 反向色谱法测定分子量，Lowery 法测定蛋白含量，DNS 法测定总糖含量，咔唑法测定葡萄糖醛酸含量，应用 ConA 体外刺激淋巴细胞增殖实验和溶血空斑实验（PFC，微量单层细胞法）检测产物的免疫学活性。

应用实验 5:

在去脂时，向浓缩的液体中加入乙醚对沉淀进行洗涤和索氏抽提，其它内容同应用实验 1。

应用实验 6:

在去蛋白时，将去脂后的固体物质溶于 4 倍重量的水中，缓慢加入硫酸铵至 30%饱和度，4℃搅拌 10 分钟，放置 1 小时，有变性的蛋白复合物析出，10000rpm 离心 30 分钟，留取上清；其它内容同应用实验 1。

应用实验 7:

在去蛋白时，将去脂后的固体物质溶于 4 倍重量的水中，缓慢加入乙醇至 20%饱和度，4℃搅拌 10 分钟，放置 1 小时，有变性的蛋白复合物析出，10000rpm 离心 30 分钟，留取上清；其它内容同应用实验 1。

应用实验 8:

在去脂时采用石油醚对沉淀进行洗涤和索氏抽提，其它内容同应用实验 1。

应用实验 9:

在纯化时采用凝胶过滤色谱法，工艺条件为采用 7.5mm×30 cm 规格的 TSKgel G4000SW 色谱柱；流动相为 0.15mol/L 的含叠氮钠 0.02%的 PBS，pH=7.4；流速 2mL/min，恒定洗脱；收集峰保留时间在 1~15 min 的样品，经过真空冷冻干燥，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品，其它内容同应用实验 1。

应用实验 10:

在纯化时采用凝胶过滤色谱法，工艺条件为采用 7.5mm×30 cm 规格的 TSKgel G4000SW 色谱柱；流动相为 0.2mol/L 的含叠氮钠 0.02%的 PBS，pH=9.0；流速 3mL/min，恒定洗脱；收集峰保留时间在 1~15 min 的样品，经过真空冷冻干燥，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白纯品，其它内容同应用实验 1。

专利名称(译)	一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂的菌株及其筛选和应用		
公开(公告)号	CN1320104C	公开(公告)日	2007-06-06
申请号	CN03144275.7	申请日	2003-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	天津医科大学		
申请(专利权)人(译)	天津医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津医科大学		
[标]发明人	陈锦英		
发明人	陈锦英		
IPC分类号	C12N1/20 C12P21/00 C07K14/26 C07K16/12 C07K1/36 A61K38/00 A61K39/395 G01N33/53 G01N30/00 C12R1/22 A61P31/04 A61P37/02		
代理人(译)	李明		
审查员(译)	冯怡		
其他公开文献	CN1524950A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种制备高效荚膜糖蛋白免疫调节剂的菌株及其筛选和应用，属于一株肺炎克雷伯氏菌及筛选方法，以及利用该菌制备荚膜糖蛋白的方法。本发明解决了目前制备的肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白出发菌不具有国内肺炎克雷伯氏菌感染的流行株的特征及产品价格昂贵等问题。其技术方案是利用现代生物技术，通过菌株筛选、培养、裂解等工序进行荚膜糖蛋白的粗提并进一步纯化，制备出肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白免疫调节剂，从而克服了抗生素用于治疗感染存在耐药性问题；弥补了细胞因子作为免疫调节剂价格昂贵、半衰期短、超生理剂量给药毒副作用大的不足。本发明为人类增强机体免疫力，抵抗病原微生物的感染提供了一条有效途径，具有重大的经济效益和社会效益。