

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810055697.7

[51] Int. Cl.

C07K 14/24 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月16日

[11] 公开号 CN 101220086A

[22] 申请日 2008.1.7

[21] 申请号 200810055697.7

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物
流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街20号

[72] 发明人 王效义 王 棠 朱紫雯 祁芝珍
吴本传 郭兆彪 杨永海 崔百忠
王祖隕 王 虎 杨瑞馥

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 鲁 兵

权利要求书3页 说明书13页 附图2页

[54] 发明名称

鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的提取、纯化方法

[57] 摘要

本发明公开了鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的一种提取、纯化方法。该方法采用玻璃珠处理和饱和硫酸铵沉淀与分子筛过滤相结合的方案，成功地从鼠疫耶尔森氏菌的培养物中提取、纯化出高纯度的天然 F1 抗原。经免疫学检测和动物保护实验证明，用本发明方法获得的天然 F1 抗原具有较高的免疫保护作用 and 检测灵敏度，如以相同浓度的本发明天然 F1 抗原和经表达获得的重组 F1 抗原 (rF1)，分别对同一小鼠腹水样本进行 F1 单克隆抗体检测，结果显示，天然 F1 抗原检测的抗体滴度明显高于重组 rF1 抗原的检测结果。本发明将在鼠疫亚单位疫苗的研制及鼠疫的检测诊断 (如免疫学检测等) 中发挥重要作用，应用前景广阔。

1、鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的提取、纯化方法，是先从鼠疫耶尔森氏菌培养物中分离培养上清和菌体沉淀，再利用饱和硫酸铵沉淀从培养上清中以及利用玻璃珠从菌体沉淀中分别提取出多部分鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原粗蛋白，再将各部分鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原粗蛋白各自通过饱和硫酸铵沉淀、凝胶过滤得到多部分纯化的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原。

2、根据权利要求 1 所述的提取、纯化方法，其特征在于：所述鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的提取、纯化方法，包括以下获取第一部分至第四部分任意一种鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 目标抗原的必要步骤：

1) 鼠疫耶尔森氏菌的培养：将鼠疫耶尔森氏菌接种到添加质量/体积百分浓度为 0.1-0.3% 木糖的心脑浸液培养基中，在 35-40℃ 下培养 12-96h；

2) 对步骤 1) 得到的鼠疫耶尔森氏菌培养物进行离心，分离出培养上清和菌体沉淀；

3) 鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原粗蛋白的提取：将步骤 2) 分离出的上清用 30-50% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，再离心，分离出上清和沉淀，弃掉上清，得到 A 部分粗蛋白；将步骤 2) 分离出的菌体沉淀用 PBS 缓冲液重悬后，加入玻璃珠，在 35-40℃、100-400rpm 下振摇 12-24h，再离心，分离出用于提取 B 部分和 C 部分粗蛋白的上清和用于提取 D 部分粗蛋白的菌体沉淀；将用于提取 B 部分和 C 部分粗蛋白的上清用 30-50% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，再离心，弃掉上清，将沉淀用 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液重新溶解后，再用 20-30% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，分离出含 B 部分粗蛋白的上清和含 C 部分粗蛋白的沉淀；将用于提取 D 部分粗蛋白的菌体沉淀重悬于 0.005-0.015M 的 PBS 缓冲液中，超声，离心，弃掉沉淀，将上清用 30-50% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，再离心，分离出上清和沉淀，弃掉上清，得到 D 部分粗蛋白；

4) 将步骤 3) 获得的 A 部分粗蛋白溶于 0.005-0.015M 的 PBS 缓冲液中后，用 20-30% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉沉淀，将上清再用 1-10% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉上清，将沉淀溶于 0.005-0.015M 的 PBS 缓冲液中，过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱，洗脱液为 pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 的 Tris-HCl 缓冲液，透析，得到第一部分天然 F1 抗原纯化蛋白。

5) 将步骤 3) 获得的含 B 部分粗蛋白的上清用 1-10% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉上清，将沉淀重新溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱，洗脱液为 pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 的 Tris-HCl 缓冲液，透析，得到第二

部分天然 F1 抗原纯化蛋白；

6) 将步骤 3) 获得的含 C 部分粗蛋白的沉淀溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，再用 20-30% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉沉淀，将上清用 1-10% 饱和硫酸铵沉淀，离心，弃掉上清，将沉淀重新溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱，洗脱液为 pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 的 Tris-HCl 缓冲液，透析，得到第三部分天然 F1 抗原纯化蛋白；

7) 将步骤 3) 获得的 D 部分粗蛋白溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，用 20-30% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉沉淀，将上清用 1-10% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉上清，将沉淀重新溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱，洗脱液为 pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 的 Tris-HCl 缓冲液，透析，得到第四部分天然 F1 抗原纯化蛋白；

第一至第四部分天然 F1 抗原纯化蛋白中的一种或它们之间任意几种组合的混合物构成所要的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 目标抗原。

3、根据权利要求 2 所述的提取、纯化方法，其特征在于：所述步骤 1) 中的鼠疫耶尔森氏菌为鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株、A1122 株、EV40 疫苗株、Tjiwidej 株、M23、P175 或 Otten。

4、根据权利要求 2 所述的提取、纯化方法，其特征在于：所述心脑浸液培养基中木糖的质量/体积百分浓度为 0.2%；鼠疫耶尔森氏菌的培养温度为 37℃，培养时间为 72h。

5、根据权利要求 2 所述的提取、纯化方法，其特征在于：所述步骤 1) 中在鼠疫耶尔森氏菌的培养过程中对其进行振荡培养，振荡速率为 100-400rpm；所述步骤 3) 中的超声条件为 5 秒间 5 秒，时间为 30min。

6、根据权利要求 2-5 任一项所述的提取、纯化方法，其特征在于：所述步骤 3) 至步骤 7) 中 30-50% 饱和硫酸铵均为 40% 饱和硫酸铵，20-30% 饱和硫酸铵均为 25% 饱和硫酸铵，1-100% 饱和硫酸铵均为 5% 饱和硫酸铵；盐析条件均为：在 3-5℃ 下盐析 5-20h；所述 PB 缓冲液的浓度均为 0.01M，PBS 缓冲液的浓度均为 0.01M。

7、根据权利要求 2-5 任一项所述的提取、纯化方法，其特征在于：所述步骤 2) 至步骤 7) 中的离心条件均为：在 4000-12000rpm 下离心 20-40min。

8、根据权利要求 2-5 任一项所述的提取、纯化方法，其特征在于：所述步骤 4) 至步骤 7) 中 Sephacryl S-200HR 凝胶柱的洗脱液均为 pH 8.0、0.01M 的 Tris-HCl 缓冲液；所用的透析液为 0.005-0.015M 的 PBS 缓冲液。

9、用权利要求 1-8 任一项所述提取、纯化方法得到的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗

原。

10、权利要求 9 所述鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原在鼠疫亚单位疫苗的制备及鼠疫的免疫检测中的应用。

鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的提取、纯化方法

技术领域

本发明属于生物领域，具体涉及从鼠疫耶尔森氏菌的培养物中提取、纯化天然 F1 抗原的方法。

背景技术

鼠疫是由鼠疫耶尔森氏菌引起的烈性传染病。人类鼠疫按发病形式分为三种：腺鼠疫、肺鼠疫和败血症鼠疫。近年来，世界鼠疫疫情呈上升趋势，2000年世界卫生组织将鼠疫列为重新抬头的传染病(WHO: human plague in 1998 and 1999. *weekly epidemiological record* 2000, 75:338-343.)。另外，鼠疫耶尔森氏菌又是一种标准的生物战剂和生物恐怖剂，美国已将鼠疫耶尔森氏菌列为恐怖分子最有可能使用的6个生物剂之一。

鼠疫灭活疫苗仅对腺鼠疫具有一定的保护作用，而且保护时间短，因此这类疫苗不适合于大规模的预防接种。美军曾在越战中使用的USP灭活疫苗于1999年停止生产。EV76疫苗株是最好的减毒活疫苗，能提供早期的保护作用，但减毒活疫苗不如灭活疫苗有效，而且有时副作用严重，同样，减毒活疫苗对肺鼠疫也无保护作用(Russell P, Eley SM, Hibbs SE, Manchee RJ, Stagg AJ, Titball RW: A comparison of Plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. *Vaccine* 1995, 13(16):1551-1556.)。亚单位疫苗能够克服传统疫苗的许多缺陷，不含有感染性组分，无致病性，而且对腺鼠疫和肺鼠疫均具有一定的免疫保护作用。因此，目前鼠疫疫苗的研究多集中在亚单位疫苗。鼠疫耶尔森氏菌的主要保护性抗原是F1（荚膜抗原）(Andrews GP, Heath DG, Anderson GW, Jr., Welkos SL, Friedlander AM: Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* C092 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect Immun* 1996, 64(6):2180-2187.)和LcrV（V-抗原）(Anderson GW, Jr., Leary SE, Williamson ED, Titball RW, Welkos SL, Worsham PL, Friedlander AM: Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 1996, 64(11):4580-4585.)。F1抗原由鼠疫耶尔森氏菌pMT1质粒上的F1操纵子编码，以多聚体的形式在细胞表面形成荚

膜, F1抗体通过阻断F1蛋白的抗吞噬作用从而具有免疫保护作用 (Du Y, Rosqvist R, Forsberg A: Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect Immun* 2002, 70(3):1453-1460.)。V 抗原是一种多功能蛋白, 与鼠疫耶尔森氏菌的抗吞噬能力有关, 具有免疫保护和免疫抑制作用 (Pettersson J, Holmstrom A, Hill J, Leary S, Frithz-Lindsten E, von Euler-Matell A, Carlsson E, Titball R, Forsberg A, Wolf-Watz H: The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* 1999, 32(5):961-976.)。虽然基于F1抗原与V抗原的新型疫苗对腺鼠疫和肺鼠疫均有效, 但F1抗原不能代表鼠疫耶尔森氏菌的全部毒力 (Titball RW, Williamson ED: *Yersinia pestis* (plague) vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2004, 4(6):965-973.)。最近, 研究人员发现在云南感染东方型鼠疫耶尔森氏菌的病人血清中检测不到V抗原的抗体, 提示某些鼠疫菌株的V抗原不具有免疫保护作用 (Li B, Jiang L, Song Q, Yang J, Chen Z, Guo Z, Zhou D, Du Z, Song Y, Wang J *et al*: Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine. *Infect Immun* 2005, 73(6):3734-3739.)。因此, 目前鼠疫疫苗的研究多采用F1和V抗原联合应用的方案。F1是鼠疫特异的保护性抗原, 是制备鼠疫疫苗的重要成分, 也是中国生物制品规程中规定的检测鼠疫的特异性抗原。

现有提取F1抗原的方法: 国内提取F1抗原的步骤主要包括: 首先, 用-40℃丙酮处理菌体, 然后用乳钵将菌体研磨成菌粉, 再用甲苯饱和的氯化钠溶液浸提, 最后用饱和硫酸铵沉淀。此法虽能提取出F1蛋白, 但不能纯化出纯度较高的F1抗原 (蛋白电泳可见明显的杂蛋白条带), 而且在提取过程中蛋白与有机溶剂接触易引起蛋白活性降低, 同时有毒溶剂对环境污染严重 (中国生物制品标准化委员会: 中国生物制品规程, 2000年版, 化学工业出版社)。国外提取F1抗原仍然用冷丙酮处理菌体, 用甲苯饱和的氯化钠溶液浸提, 饱和硫酸铵沉淀, 最后凝胶过滤。此法提取的蛋白纯度较高, 但仍然使用了有机溶剂, 无法避免有机溶剂对蛋白的影响和对环境的污染 (Andrews GP, Heath DG, Anderson GW, Jr., Welkos SL, Friedlander AM: Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* C092 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect Immun* 1996, 64(6):2180-2187.)。

发明内容

本发明的目的是提供一种从鼠疫耶尔森氏菌的培养物中提取、纯化天然 F1 抗原的方法。

本发明所提供的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的提取、纯化方法，是先从鼠疫耶尔森氏菌培养物中分离培养上清和菌体沉淀，再利用饱和硫酸铵沉淀从培养上清中以及利用玻璃珠从菌体沉淀中分别提取出多部分鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原粗蛋白，再将各部分鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原粗蛋白各自通过饱和硫酸铵沉淀、凝胶过滤得到多部分纯化的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原。

具体来讲，上述鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的提取、纯化方法，可包括以下获取第一部分至第四部分任意一种鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 目标抗原的必要步骤：

1) 鼠疫耶尔森氏菌的培养：将鼠疫耶尔森氏菌接种到添加质量/体积(W/V)百分浓度为 0.1-0.3%木糖的心脑浸液培养基中，在 35-40℃下培养 12-96h；

2) 对步骤 1) 得到的鼠疫耶尔森氏菌培养物进行离心，分离出上清和菌体沉淀；

3) 鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原粗蛋白的提取：将步骤 2) 分离出的上清用 30-50% (W/V) 饱和硫酸铵沉淀，盐析，再离心，分离出上清和沉淀，弃掉上清，得到 A 部分粗蛋白；将步骤 2) 分离出的菌体沉淀用 PBS 缓冲液重悬后，加入玻璃珠，在 35-40℃、100-400rpm 下振摇 12-24h，再离心，分离出用于提取 B 部分和 C 部分粗蛋白的上清和用于提取 D 部分粗蛋白的菌体沉淀；将用于提取 B 部分和 C 部分粗蛋白的上清用 30-50% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，再离心，弃掉上清，将沉淀用 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液重新溶解后，再用 20-30% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，分离出含 B 部分粗蛋白的上清和含 C 部分粗蛋白的沉淀；将用于提取 D 部分粗蛋白的菌体沉淀重悬于 0.005-0.015M 的 PBS 缓冲液中，超声，离心，弃掉沉淀，将上清用 30-50% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，再离心，分离出上清和沉淀，弃掉上清，得到 D 部分粗蛋白；

4) 将步骤 3) 获得的 A 部分粗蛋白溶于 0.005-0.015M 的 PBS 缓冲液中后，用 20-30% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉沉淀，将上清再用 1-10% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉上清，将沉淀溶于 0.005-0.015M 的 PBS 缓冲液中，过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱，洗脱液为 pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 的 Tris-HCl 缓冲液，透析，得到第一部分天然 F1 抗原纯化蛋白。

5) 将步骤 3) 获得的含 B 部分粗蛋白的上清用 1-10% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉上清，将沉淀重新溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱，洗脱液为 pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 的 Tris-HCl 缓冲液，透析，得到第二部分天然 F1 抗原纯化蛋白；

6) 将步骤 3) 获得的含 C 部分粗蛋白的沉淀溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，再用 20-30% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉沉淀，将上清用 1-10% 饱和硫酸铵沉淀，离心，弃掉上清，将沉淀重新溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，过 Sephacryl

S-200HR 凝胶柱，洗脱液为 pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 的 Tris-HCl 缓冲液，透析，得到第三部分天然 F1 抗原纯化蛋白；

7) 将步骤 3) 获得的 D 部分粗蛋白溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，用 20-30% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉沉淀，将上清用 1-10% 饱和硫酸铵沉淀，盐析，离心，弃掉上清，将沉淀重新溶于 0.005-0.015M 的 PB 缓冲液中，过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱，洗脱液为 pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 的 Tris-HCl 缓冲液，透析，得到第四部分天然 F1 抗原纯化蛋白；

第一至第四部分天然 F1 抗原纯化蛋白（成分相同）中的一种或它们之间任意几种组合的混合产物（混合比例任意）构成所要的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 目标抗原。

在上述鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的提取、纯化方法中，步骤 1) 所用的鼠疫耶尔森氏菌可为任意可产生 F1 抗原的鼠疫耶尔森氏菌菌株，如鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株、EV40 疫苗株、Tjiwidej 株、A1122 株、M23、P175 或 Otten 等，优选为鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株。

步骤 1) 中所述心脑浸液培养基中木糖的质量/体积百分浓度优选为 0.2%；鼠疫耶尔森氏菌的培养温度优选为 37℃，培养时间优选为 72h。

此外，为提供菌体的生长速率，步骤 1) 中在鼠疫耶尔森氏菌的培养过程中可对其进行振荡培养，振荡速率可为 100-400rpm。

步骤 3) 中的超声条件为 5 秒间 5 秒，时间为 30min。

步骤 3) 至步骤 7) 中 30-50% 饱和硫酸铵均优选为 40% 饱和硫酸铵，20-30% 饱和硫酸铵均优选为 25% 饱和硫酸铵，1-100% 饱和硫酸铵均优选为 5% 饱和硫酸铵；盐析条件均为：在 3-5℃ 下盐析 5-20h，优选为：在 4℃ 下盐析 12h；所述 PB 缓冲液的浓度均优选为 0.01M，PBS 缓冲液的浓度均优选为 0.01M；

步骤 2) 至步骤 7) 中的离心条件均为：在 4000-12000rpm 下离心 20-40min。

步骤 4) 至步骤 7) 中 Sephacryl S-200HR 凝胶柱的洗脱液均优选为 pH 8.0、0.01M 的 Tris-HCl 缓冲液；所用的透析液为 0.005-0.015M 的 PBS 缓冲液，优选为 0.01M 的 PBS 缓冲液。

步骤 4) 至步骤 7) 中得到的四部分天然 F1 抗原纯化蛋白均为本发明所要得到的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原。

用上述方法得到的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原也属于本发明的保护范围。

第一至第四部分天然 F1 抗原纯化蛋白中的一种或它们之间任意几种组合的混合产物均构成所要的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 目标抗原。

本发明提供了一种鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的提取、纯化方法。该方法采用

玻璃珠替代有机溶剂处理，饱和硫酸铵沉淀和分子筛过滤相结合的方案，成功地从鼠疫耶尔森氏菌的培养物中提取、纯化出高纯度的天然 F1 抗原。此法不仅简单有效，而且还避免了纯化过程中有机溶剂对蛋白活性的影响和对环境的污染。经免疫学检测和动物保护实验证明，用本发明方法获得的天然 F1 抗原具有较高的免疫保护作用 and 检测灵敏度，如以相同浓度的本发明天然 F1 抗原和经表达获得的重组 F1 抗原（rF1），分别对同一小鼠腹水样本进行 F1 单克隆抗体检测，结果显示，天然 F1 抗原检测的抗体滴度明显高于重组 rF1 抗原的检测结果，表明若将本发明的天然 F1 抗原应用于鼠疫亚单位疫苗的研制及鼠疫的检测诊断，将具有更好的免疫保护和更高的敏感性。本发明将在鼠疫亚单位疫苗的研制及鼠疫的检测诊断（如免疫检测等）中发挥重要作用，应用前景广阔。

下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

图 1 为鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原提取、纯化过程的流程图

图 2 为提取、纯化后的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的 15% SDS-PAGE 检测结果

具体实施方式

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法，具体步骤可参见：《分子克隆实验指南》（J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔著，黄培堂等译，第三版，2002，科学出版社）。

所述百分比浓度如无特别说明均为质量/体积(W/V)百分比浓度或体积/体积(V/V)百分比浓度。

所用引物合成工作由上海英骏公司完成。

实施例 1、鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株天然 F1 抗原提取、纯化及其免疫学检测和免疫保护作用评价

一、鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株天然 F1 抗原提取、纯化

以鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株为例，用本发明的方法从鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株中提取、纯化天然 F1 抗原，具体过程如图 1 所示，包括以下步骤：

1、鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株的培养

将鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株（购自兰州生物制品研究所）接种到 5mL 添加 0.2% (W/V, 0.1-0.3% 均可) 木糖的心脑浸液培养基（购自 BD 公司，将 37g 培养基溶于 1L 纯水中）中，在 37℃（35-40℃ 均可）下培养 24h，然后取 300μl 菌液，再接种到 2L 添加 0.2% (0.1-0.3% 均可) 木糖的心脑浸液培养基中，在 37℃（35-40℃ 均可）、150rpm（100-400rpm 均可）下振荡培养 72h。

2、鼠疫耶尔森氏菌培养物的处理

对步骤1得到的鼠疫耶尔森氏菌培养物进行离心(4000rpm, 30min), 分离出上清和菌体沉淀。

3、鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原粗蛋白的提取

将步骤2分离出的上清用40%(W/V, 30-50%均可)饱和硫酸铵沉淀, 置4℃冰箱中盐析12h, 再离心(8000rpm, 30min), 分离出上清和沉淀, 弃掉上清, 得到A部分粗蛋白; 将步骤2分离出的菌体沉淀用200mL PBS缓冲液(0.01M)重悬后, 置于三角瓶中, 加入高压灭菌后的玻璃珠, 在37℃(35-40℃均可)、400rpm(100-400rpm均可)下振摇18h(12-24h均可), 再离心(12000rpm, 30min), 分离出用于提取B部分和C部分粗蛋白的上清和用于提取D部分粗蛋白的菌体沉淀; 将用于提取B部分和C部分粗蛋白的上清用40%(30-50%均可)饱和硫酸铵沉淀, 置4℃冰箱中盐析12h, 再离心, 弃掉上清, 将沉淀用200mL PB缓冲液(0.01M)重新溶解后, 再用25%(20-30%均可)饱和硫酸铵沉淀, 置4℃冰箱中盐析12h, 离心(8000rpm, 30min), 分离出含B部分粗蛋白的上清和含C部分粗蛋白的沉淀; 将用于提取D部分粗蛋白的菌体沉淀重悬于20mL PBS缓冲液(0.01M)中, 超声(5秒间5秒, 30min), 离心(12000rpm, 30min), 弃掉沉淀, 将上清用0.01M的PB缓冲液稀释至200mL后, 用40%(30-50%均可)饱和硫酸铵沉淀, 置4℃冰箱中盐析12h, 再离心(8000rpm, 30min), 分离出上清和沉淀, 弃掉上清, 得到D部分粗蛋白。

4、第一部分天然 F1 抗原纯化蛋白的获得

将步骤3获得的A部分粗蛋白溶于200mL PBS缓冲液(0.01M)中后, 用25%(20-30%均可)饱和硫酸铵沉淀, 置4℃冰箱中盐析12h, 离心(8000rpm, 30min), 弃掉沉淀, 将上清再用5%(1-10%均可)饱和硫酸铵沉淀, 置4℃冰箱中盐析12h, 离心(8000rpm, 30min), 弃掉上清, 将沉淀溶于15mL(10-20mL均可)PBS缓冲液(0.01M)中, 过Sephacryl S-200HR凝胶柱(购自Amersham Biosciences公司), 以pH 8.0、0.01M(pH 7.5-8.5、0.005-0.015M均可)的Tris-HCl缓冲液为洗脱液洗柱, 控制流速为1-2mL/min, 收集蛋白溶液, 将蛋白溶液装透析袋, 置于2000mL PBS透析液(0.01M)中透析12h, 每4h换一次液。将得到的纯化蛋白进行15% SDS-PAGE检测, 检测结果如图2所示(泳道M为低分子量标准蛋白Marker, 分子量范围为14.4-97.4 kDa, 泳道A为第一部分天然 F1 抗原纯化蛋白), 结果得到了纯度较高(98%)的17 kDa的第一部分天然 F1 抗原蛋白。

5、第二部分天然 F1 抗原纯化蛋白的获得

将步骤3获得的含B部分粗蛋白的上清用5%(1-10%均可)饱和硫酸铵沉淀,

置 4℃冰箱中盐析 12h, 离心 (8000rpm, 30min), 弃掉上清, 将沉淀重新溶于 15mL (10-20mL 均可) PB 缓冲液 (0.01M) 中, 过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱, 以 pH 8.0、0.01M (pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 均可) 的 Tris-HCl 缓冲液为洗脱液洗柱, 控制流速为 1-2mL/min, 收集蛋白溶液, 将蛋白溶液装透析袋, 置于 2000mL PBS 透析液 (0.01M) 中透析 12h, 每 4h 换一次液。将得到的纯化蛋白进行 15% SDS-PAGE 检测, 检测结果如图 2 所示 (泳道 M 为低分子量标准蛋白 Marker, 分子量范围为 14.4-97.4 kDa, 泳道 B 为第二部分天然 F1 抗原纯化蛋白), 结果得到了纯度较高 (98%) 的 17 kDa 的第二部分天然 F1 抗原蛋白。

6、第三部分天然 F1 抗原纯化蛋白的获得

将步骤 3 获得的含 C 部分粗蛋白的沉淀溶于 200mL PB 缓冲液 (0.01M) 中, 再用 25% (20-30% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 置 4℃冰箱中盐析 12h, 离心 (8000rpm, 30min), 弃掉沉淀, 将上清用 5% (1-10% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 置 4℃冰箱中盐析 12h, 离心 (8000rpm, 30min), 弃掉上清, 将沉淀重新溶于 15mL (10-20mL 均可) PB 缓冲液 (0.01M) 中, 过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱, 以 pH 8.0、0.01M (pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 均可) 的 Tris-HCl 缓冲液为洗脱液洗柱, 控制流速为 1-2mL/min, 收集蛋白溶液, 将蛋白溶液装透析袋, 置于 2000mL PBS 透析液 (0.01M) 中透析 12h, 每 4h 换一次液。将得到的纯化蛋白进行 15% SDS-PAGE 检测, 检测结果如图 2 所示 (泳道 M 为低分子量标准蛋白 Marker, 分子量范围为 14.4-97.4 kDa, 泳道 C 为第三部分天然 F1 抗原纯化蛋白), 结果得到了纯度较高 (98%) 的 17 kDa 的第三部分天然 F1 抗原蛋白。

7、第四部分天然 F1 抗原纯化蛋白的获得

将步骤 3 获得的 D 部分粗蛋白溶于 200mL PB 缓冲液 (0.01M) 中, 用 25% (20-30% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 置 4℃冰箱中盐析 12h, 离心 (8000rpm, 30min), 弃掉沉淀, 将上清用 5% (1-10% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 置 4℃冰箱中盐析 12h, 离心 (8000rpm, 30min), 弃掉上清, 将沉淀重新溶于 15mL (10-20mL 均可) PB 缓冲液 (0.01M) 中, 过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱, 以 pH 8.0、0.01M (pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 均可) 的 Tris-HCl 缓冲液为洗脱液洗柱, 控制流速为 1-2mL/min, 收集蛋白溶液, 将蛋白溶液装透析袋, 置于 2000mL PBS 透析液 (0.01M) 中透析 12h, 每 4h 换一次液。将得到的纯化蛋白进行 15% SDS-PAGE 检测, 检测结果如图 2 所示 (泳道 M 为低分子量标准蛋白 Marker, 分子量范围为 14.4-97.4 kDa, 泳道 D 为第四部分天然 F1 抗原纯化蛋白), 结果得到了纯度较高 (98%) 的 17 kDa 的第四部分天然 F1 抗原蛋白。

步骤 4 至步骤 7 中得到的四部分天然 F1 抗原纯化蛋白的成分相同, 它们之中任

一部分或是任意几部分的以任意比例的混合物均为本发明所要得到的鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原。

二、鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株天然 F1 抗原的免疫学检测和免疫保护作用评价

1、鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株天然 F1 抗原的免疫学检测

1) 重组 F1 抗原 (rF1) 的制备

根据鼠疫耶尔森氏菌 C092 株的基因组序列 (GenBank 登录号: AL590842) 设计一对引物, 引物序列如下:

P1 (上游引物): 5' -CGGGATCCATGAAAAAATCAGTTCC - 3'

P2 (下游引物): 5' -GCCCAAGCTTTTATTGGTTAGATACGGTTAC - 3'

以鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株的基因组 DNA 为模板, 在引物 P1 和 P2 的引导下 PCR 扩增重组 F1 抗原 (rF1) 基因, 反应结束后, 对 PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收并纯化约 980bp 的目的片段, 并将其克隆入载体 pET32a (Novagen 公司) 多克隆位点的 *BamH* I 和 *Hind* III 酶切位点之间, 得到 rF1 基因的重组表达载体, 命名为 pET-32a/rF1, 将 pET-32a/rF1 转化大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 感受态细胞, 筛选阳性重组子, 以 pET32a 空载体转化菌为对照, 在 37°C 下培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6-0.8 时, 添加 0.5mM IPTG, 在相同条件下诱导 4-5 小时。培养结束后, 对将 pET-32a/rF1 转化菌的表达蛋白进行 Western-blot 鉴定, 以兔抗鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株免疫血清作为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗, 结果显示 pET-32a/rF1 转化菌表达蛋白与兔抗鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株免疫血清反应后在 36kDa 处有一特异的反应条带, 而 pET32a 空载体转化菌却没有相应的条带出现, 表明 pET-32a/rF1 转化菌表达蛋白具有较高的抗原性, 纯化, 得到重组 F1 抗原。

2) 小鼠腹水中鼠疫耶尔森氏菌 F1 蛋白单克隆抗体的获得

将步骤一提取的本发明天然 F1 抗原 (四个部分天然 F1 抗原的混合) 免疫 6-8 周龄雌性 BALB/C 小鼠 3 次 (每次间隔 2 周), 免疫剂量为每次 25-50μg, 第 3 次免疫后 9 天采血测其效价, 融合前 3 天加强免疫一次。取加强免疫后第 3 天的小鼠脾细胞与对数生长期的骨髓瘤细胞 SP2/0 按 5-10:1 的比例混合, 逐滴加入 0.8-0.9mL 预热的融合剂 (50% PEG1500, Sigma 公司), 边加边搅动, 然后加入无血清培养基 (购自 GIBCO 公司) 终止融合。接着以 800rpm 离心 5min, 弃上清液, 将细胞重悬浮于 HAT 培养基 (购自 GIBCO 公司) 中, 至细胞浓度为 1-2×10⁶/mL, 再接种于含有饲养细胞的 96 孔培养板中, 每孔 0.1mL。将该 96 孔培养板置 37°C、5% CO₂ 孵箱中培养, 培养 8-12 天, 克隆可长至孔底面积的 1/3-1/2, 此时可取培养液上清, 用 ELISA 法检测有无抗体产生。

取出抗体阳性孔内的杂交瘤细胞，用有限稀释法，将细胞分配到另一 96 孔培养板内，这时可换用 HT 培养基（购自 GIBCO 公司）继续培养。两周左右检测，对仍产生抗体者再进行克隆化（用有限稀释法），如此进行 3-5 次，以保证确是由单克隆细胞分泌的单克隆抗体。在此过程中，对分泌抗体的阳性孔细胞要及时扩大培养，冻存。

对产生抗体的细胞克隆，一方面检查其染色体数；另一方面，取其培养上清，检测抗体的免疫球蛋白类别、亚类和特异性。将鉴定正确的杂交瘤细胞注入 BALB/C 小鼠腹腔内（预先注射过石蜡油），7-10 天后收集腹水（Prior JL, Titball RW: Monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* lipopolysaccharide detect bacteria cultured at 28°C or 37°C. *Molecular and Cellular Probes* 2002, 16: 251-256），得到含鼠疫耶尔森氏菌 F1 蛋白单克隆抗体的小鼠腹水。

3) 用鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株天然 F1 抗原测定鼠疫耶尔森氏菌 F1 蛋白单克隆抗体的效价

由于被鼠疫感染的人及动物可产生强烈的针对 F1 抗原的体液免疫，因此对 F1 抗体的检测是鼠疫血清学检测的基础。用步骤一获得的鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株天然 F1 抗原（四个部分天然 F1 抗原混合）和步骤 1) 获得的重组 F1 抗原（rF1）进行间接 ELISA 试验（具体步骤可参见：Goodin J L, Nellis D F, Powell B S et al: Purification and protective efficacy of monomeric and modified *Yersinia pestis* capsular F1-V antigen fusion proteins for vaccination against plague. *Protein Expression and Purification* 2007, 53: 63 - 79.），检测步骤 2) 获得的小鼠腹水中鼠疫耶尔森氏菌 F1 蛋白单克隆抗体的效价，检测方法为：用 F1 抗原（100ul/孔，500ng/mL）包被酶标板，分别加不同稀释度（1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400）的含鼠疫耶尔森氏菌 F1 蛋白单克隆抗体的小鼠腹水，孵育后洗涤（以除去未结合的杂蛋白质），然后加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 二抗（购自 Sigma 公司），孵育后洗涤，加底物孵育 30 分钟后，终止酶促反应，用光电比色测定抗体效价。检测结果如表 1 所示，以相同蛋白浓度的本发明天然 F1 抗原和重组 rF1 抗原分别对同一小鼠腹水样本进行间接 ELISA 检测，结果天然 F1 抗原检测的敏感性明显高于重组 rF1 抗原，可用于鼠疫检测的血清学分析。

表 1 用 F1 抗原测定小鼠腹水中 F1 蛋白单克隆抗体的滴度

抗原	F1 抗体最高滴度（3 次结果）		
重组 F1 抗原	1:51200	1:3200	1:12800
天然 F1 抗原	1:102400	1:25600	1:102400

2、鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株天然 F1 抗原的免疫保护效力测定

用下述实验检测步骤一获得的鼠疫耶尔森氏菌 EV76 疫苗株天然 F1 抗原（四个部分天然 F1 抗原混合）的免疫保护效力，检测方法为：将 24 只 6-8 周雌性 BALB/c 小鼠（购自军事医学科学院实验动物中心）随机分成 3 组，2 个剂量组（分别注射 F1(10 μ g)+50 μ L 铝佐剂和 F1(20 μ g)+50 μ L 铝佐剂)和 1 个对照组（注射等量铝佐剂），每组 8 只小鼠。在第一次肌肉注射免疫后的第 21 天加强免疫一次。第一次免疫后第 8 周用 100000cfu 鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株皮下注射攻毒，观察 14 天。结果如表 2 所示，对照组 8 只小鼠全部死亡，而两个天然 F1 剂量组的小鼠全部存活，而且健康状况良好，表明用本发明方法提取、纯化的天然 F1 蛋白具有良好的免疫保护作用，可用于制备鼠疫亚单位疫苗。

表 2 天然 F1 抗原免疫保护效果的检测结果

疫 苗	攻毒剂量(cfu)	小鼠总数(只)	存活数(只)	存活率(%)
F1(10 μ g)+铝佐剂	10000	8	8	100
F1(20 μ g)+铝佐剂	10000	8	8	100
等量铝佐剂	10000	8	0	0

此外，用上述相同的方法分别用第一至第四部分鼠疫耶尔森氏菌天然F1抗原分别测定小鼠腹水中F1蛋白单克隆抗体的滴度（蛋白浓度相同）及其免疫保护效果（免疫剂量相同），结果第一至第四部分鼠疫耶尔森氏菌天然F1抗原的敏感性相同，均明显高于重组rF1抗原，可用于鼠疫检测的血清学分析；而且，四部分鼠疫耶尔森氏菌天然F1抗原的免疫保护作用也相同。上述检测结果证明，用本发明方法提取的四部分鼠疫耶尔森氏菌天然F1抗原不仅成分相同，且免疫保护效果相同，因而这四部分天然F1抗原既可单独使用，也可按任意比例混合使用。

实施例 2、鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株天然 F1 抗原提取、纯化及其免疫学检测和免疫保护作用评价

一、鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株天然 F1 抗原提取、纯化

用本发明的方法从鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株中提取、纯化天然 F1 抗原，具体过程如图 1 所示，包括以下步骤：

1、鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株的培养

将鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株（军事医学科学院微生物流行病学研究所菌种库提供）接种到 5mL 添加 0.1% (W/V, 0.1-0.3% 均可) 木糖的心脑浸液培养基（购自 BD 公司，

37g 溶于 1L 纯水中) 中, 在 35°C (35-40°C 均可)、250rpm 下培养 12h, 然后取 300 μ l 菌液, 再接种到 2L 添加 0.3% (0.1-0.3% 均可) 木糖的心脑浸液培养基中, 在 40°C (35-40°C 均可)、100rpm (100-400rpm 均可) 下振荡培养 72h。

2、鼠疫耶尔森氏菌培养物的处理

对步骤 1 得到的鼠疫耶尔森氏菌培养物进行离心 (4000rpm, 40min), 分离出上清和菌体沉淀。

3、鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原粗蛋白的提取

将步骤 2 分离出的上清用 30% (W/V, 30-50% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 在 3°C 下盐析 20h, 再离心 (8000rpm, 40min), 分离出上清和沉淀, 弃掉上清, 得到 A 部分粗蛋白; 将步骤 2 分离出的菌体沉淀用 200mL PBS 缓冲液 (0.015M) 重悬后, 置于三角瓶中, 加入高压灭菌后的玻璃珠, 在 35°C (35-40°C 均可)、300rpm (100-400rpm 均可) 下振荡 24h (12-24h 均可), 再离心 (12000rpm, 20min), 分离出用于提取 B 部分和 C 部分粗蛋白的上清和用于提取 D 部分粗蛋白的菌体沉淀; 将用于提取 B 部分和 C 部分粗蛋白的上清用 50% (30-50% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 在 5°C 下盐析 10h, 再离心, 弃掉上清, 将沉淀用 200mL PB 缓冲液 (0.015M) 重新溶解后, 再用 20% (20-30% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 置 4°C 冰箱中盐析 12h, 离心 (8000rpm, 35min), 分离出含 B 部分粗蛋白的上清和含 C 部分粗蛋白的沉淀; 将用于提取 D 部分粗蛋白的菌体沉淀重悬于 20mL PBS 缓冲液 (0.015M) 中, 超声 (5 秒间 5 秒, 30min), 离心 (12000rpm, 30min), 弃掉沉淀, 将上清用 0.005M 的 PB 缓冲液稀释至 200mL 后, 用 45% (30-50% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 置 4°C 冰箱中盐析 12h, 再离心 (8000rpm, 25min), 分离出上清和沉淀, 弃掉上清, 得到 D 部分粗蛋白。

4、第一部分天然 F1 抗原纯化蛋白的获得

将步骤 3 获得的 A 部分粗蛋白溶于 200mL PBS 缓冲液 (0.005M) 中后, 用 25% (20-30% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 置 4°C 冰箱中盐析 15h, 离心 (8000rpm, 35min), 弃掉沉淀, 将上清再用 10% (1-10% 均可) 饱和硫酸铵沉淀, 置 4°C 冰箱中盐析 5h, 离心 (8000rpm, 25min), 弃掉上清, 将沉淀溶于 15mL (10-20mL 均可) PBS 缓冲液 (0.005M) 中, 过 Sephacryl S-200HR 凝胶柱 (购自 Amersham Biosciences 公司), 以 pH 8.5、0.015M (pH 7.5-8.5、0.005-0.015M 均可) 的 Tris-HCl 缓冲液为洗脱液洗柱, 控制流速为 1-2mL/min, 收集蛋白溶液, 将蛋白溶液装透析袋, 置于 2000mL PBS 透析液 (0.015M) 中透析 12h, 每 4h 换一次液。将得到的纯化蛋白进行 15% SDS-PAGE 检测, 结果得到了纯度较高 (97%) 的 17kDa 的第一部分天然 F1 抗原蛋白。

5、第二部分天然 F1 抗原纯化蛋白的获得

将步骤3获得的含B部分粗蛋白的上清用1%（1-10%均可）饱和硫酸铵沉淀，在5℃下盐析12h，离心（8000rpm，30min），弃掉上清，将沉淀重新溶于15mL（10-20mL均可）PB缓冲液（0.015M）中，过Sephacryl S-200HR凝胶柱，以pH 7.5、0.005M（pH 7.5-8.5、0.005-0.015M均可）的Tris-HCl缓冲液为洗脱液洗柱，控制流速为1-2mL/min，收集蛋白溶液，将蛋白溶液装透析袋，置于2000mL PBS透析液（0.005M）中透析16h，每4h换一次液。将得到的纯化蛋白进行15% SDS-PAGE检测，结果得到了纯度较高（97%）的17kDa的第二部分天然F1抗原蛋白。

6、第三部分天然F1抗原纯化蛋白的获得

将步骤3获得的含C部分粗蛋白的沉淀溶于200mL PB缓冲液（0.015M）中，再用30%（20-30%均可）饱和硫酸铵沉淀，置4℃冰箱中盐析18h，离心（8000rpm，30min），弃掉沉淀，将上清用5%（1-10%均可）饱和硫酸铵沉淀，置4℃冰箱中盐析8h，离心（8000rpm，30min），弃掉上清，将沉淀重新溶于15mL（10-20mL均可）PB缓冲液（0.01M）中，过Sephacryl S-200HR凝胶柱，以pH 8.0、0.01M（pH 7.5-8.5、0.005-0.015M均可）的Tris-HCl缓冲液为洗脱液洗柱，控制流速为1-2mL/min，收集蛋白溶液，将蛋白溶液装透析袋，置于2000mL PBS透析液（0.01M）中透析12h，每4h换一次液。将得到的纯化蛋白进行15% SDS-PAGE检测，结果得到了纯度较高（97%）的17kDa的第三部分天然F1抗原蛋白。

7、第四部分天然F1抗原纯化蛋白的获得

将步骤3获得的D部分粗蛋白溶于200mL PB缓冲液（0.005M）中，用25%（20-30%均可）饱和硫酸铵沉淀，置4℃冰箱中盐析12h，离心（8000rpm，30min），弃掉沉淀，将上清用8%（1-10%均可）饱和硫酸铵沉淀，在3℃下盐析10h，离心（8000rpm，30min），弃掉上清，将沉淀重新溶于15mL（10-20mL均可）PB缓冲液（0.005M）中，过Sephacryl S-200HR凝胶柱，以pH 8.0、0.01M（pH 7.5-8.5、0.005-0.015M均可）的Tris-HCl缓冲液为洗脱液洗柱，控制流速为1-2mL/min，收集蛋白溶液，将蛋白溶液装透析袋，置于2000mL PBS透析液（0.005M）中透析20h，每4h换一次液。将得到的纯化蛋白进行15% SDS-PAGE检测，结果得到了纯度较高（97%）的17kDa的第四部分天然F1抗原蛋白。

步骤4）至步骤7）中得到的四部分天然F1抗原纯化蛋白（成分相同）或是任意几部分的混合物（混合比例任意）均为本发明所要得到的鼠疫耶尔森氏菌天然F1抗原。

二、鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株天然 F1 抗原的免疫学检测和免疫保护作用评价

1、用鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株天然 F1 抗原测定鼠疫耶尔森氏菌 F1 蛋白单克隆抗体的效价

用鼠疫耶尔森氏菌 A1122株天然F1抗原（四个部分天然F1抗原混合）测定鼠疫耶尔森氏菌F1蛋白单克隆抗体的效价，检测方法与实施例1相同。检测结果如表3所示，以相同蛋白浓度的本发明鼠疫耶尔森氏菌 A1122株天然F1抗原和重组rF1抗原分别对同一小鼠腹水样本进行间接ELISA检测，结果鼠疫耶尔森氏菌 A1122株天然F1抗原检测的敏感性明显高于重组rF1抗原，可用于鼠疫检测的血清学分析。

表3 用鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株天然 F1 抗原测定小鼠腹水中 F1 蛋白单克隆抗体的滴度

抗原	F1 抗体最高滴度（3 次结果）		
重组 F1 抗原	1:25600	1:3200	1:12800
天然 F1 抗原	1:51200	1:25600	1:25600

2、鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株天然 F1 抗原的免疫保护效力测定

用下述实验检测步骤一获得的鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株天然 F1 抗原（四个部分天然 F1 抗原混合）的免疫保护效力，检测方法与实施例 1 相同。结果如表 4 所示，对照组 10 只小鼠全部死亡，而两个天然 F1 剂量组的小鼠全部存活，而且健康状况良好，表明用本发明方法提取、纯化的鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株天然 F1 蛋白具有良好的免疫保护作用，可用于制备鼠疫亚单位疫苗。

表4 鼠疫耶尔森氏菌 A1122 株天然 F1 抗原免疫保护效果的检测结果

疫苗	攻毒剂量(cfu)	小鼠总数(只)	存活数(只)	存活率(%)
F1(10 μ g)+铝佐剂	10000	10	10	100
F1(20 μ g)+铝佐剂	10000	10	10	100
等量铝佐剂	10000	10	0	0

此外，用上述相同的方法分别用第一至第四部分鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原测定小鼠腹水中 F1 蛋白单克隆抗体的滴度（蛋白浓度相同）及其免疫保护效果（免疫剂量相同），结果第一至第四部分鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的敏感性相同，均明显高于重组 rF1 抗原，可用于鼠疫检测的血清学分析；而且，四部分鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原的免疫保护作用也相同。上述检测结果证明，用本发明方法提取的四部分鼠疫耶尔森氏菌天然 F1 抗原不仅成分相同，且免疫保护效果相同，因而这四部分天然 F1 抗原既可单独使用，也可按任意比例混合使用。

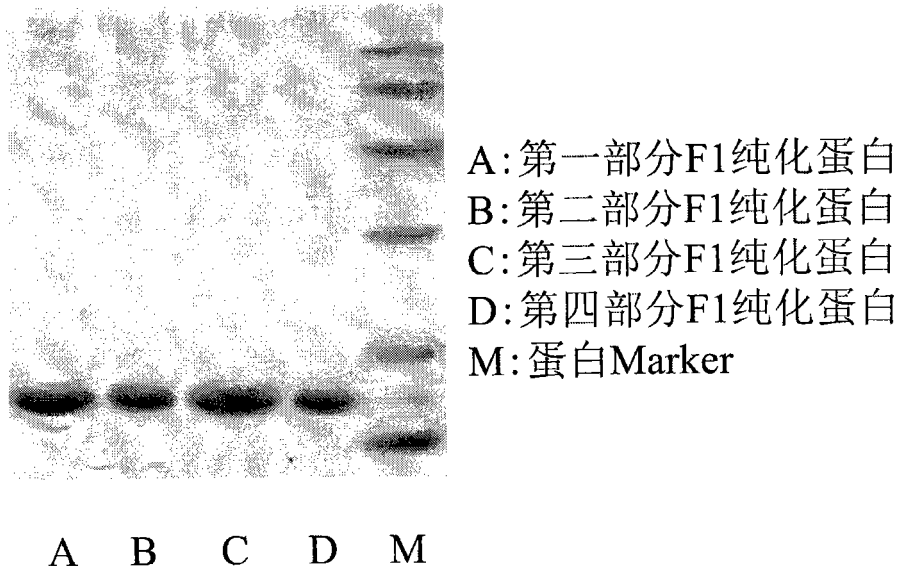


图 2

专利名称(译)	鼠疫耶尔森氏菌天然F1抗原的提取、纯化方法		
公开(公告)号	CN101220086A	公开(公告)日	2008-07-16
申请号	CN200810055697.7	申请日	2008-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	王效义 王棠 朱紫雯 祁芝珍 吴本传 郭兆彪 杨永海 崔百忠 王祖隕 王虎 杨瑞馥		
发明人	王效义 王棠 朱紫雯 祁芝珍 吴本传 郭兆彪 杨永海 崔百忠 王祖隕 王虎 杨瑞馥		
IPC分类号	C07K14/24 A61K39/02 A61P31/04 G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	Y02A50/407		
代理人(译)	鲁兵		
其他公开文献	CN101220086B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了鼠疫耶尔森氏菌天然F1抗原的一种提取、纯化方法。该方法采用玻璃珠处理和饱和硫酸铵沉淀与分子筛过滤相结合的方案，成功地从鼠疫耶尔森氏菌的培养物中提取、纯化出高纯度的天然F1抗原。经免疫学检测和动物保护实验证明，用本发明方法获得的天然F1抗原具有较高的免疫保护作用 and 检测灵敏度，如以相同浓度的本发明天然F1抗原和经表达获得的重组F1抗原(rF1)，分别对同一小鼠腹水样本进行F1单克隆抗体检测，结果显示，天然F1抗原检测的抗体滴度明显高于重组rF1抗原的检测结果。本发明将在鼠疫亚单位疫苗的研制及鼠疫的检测诊断(如免疫学检测等)中发挥重要作用，应用前景广阔。

