

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510064273.3

[51] Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年10月18日

[11] 公开号 CN 1847392A

[22] 申请日 2005.4.14

[21] 申请号 200510064273.3

[71] 申请人 长江大学

地址 434023 湖北省荆州市南环路1号

[72] 发明人 荣俊 程太平 刘晓娜 杨待建

[74] 专利代理机构 北京市中实友知识产权代理有限公司

代理人 熊成香

权利要求书1页 说明书8页

[54] 发明名称

一种用大肠杆菌生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗生产的菌种和用该菌种生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法，该菌种的特征是：*Escherichia coli* BL21/pBV220-VP2，CCTCC NO: M204037；该菌种的构建过程是从分离的传染性法氏囊病超强毒株中克隆出VP2基因，将它插入pBV220质粒上构建成原核表达质粒，用该表达质粒转化大肠杆菌BL21菌种；通过热诱导的方法使*Escherichia coli* BL21/pBV220-VP2菌种表达VP2蛋白后，经过适度纯化后可加入油乳剂制成油乳剂疫苗。此疫苗可用于肉用仔鸡、蛋鸡、种鸡预防传染性法氏囊病。该疫苗不造成对鸡法氏囊的损伤，不影响其它疫苗的免疫效果，也没有引起病源扩散的危险。

1、一种用于鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗生产的菌种，其特征在于：*Escherichia coli* BL21/pBV220-VP2, CCTCC NO: M204037。

2、一种用权利要求 1 所述的菌种生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法，其特征在于该菌种经热诱导能表达传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白，这种蛋白是可溶性具有抗原活性的非融合蛋白，可用于制备鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗。

3、根据权利要求 2 所述的生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法，其特征在于该菌种经诱导表达、冷冻干燥后，可直接用作活菌载体疫苗，预防鸡传染性法氏囊病。

4、根据权利要求 2 所述的生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法，其特征在于该菌种诱导表达出来的 VP2 蛋白，经过纯化后可作为基因工程抗原，用于传染性法氏囊病的抗体检测。

一种用大肠杆菌生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法

技术领域:

本发明涉及一种用大肠杆菌生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法,属基因工程领域。

背景技术:

传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的鸡的免疫抑制性传染病,它的传染性极强,能在一个鸡群中迅速传播。

目前预防这种疾病有两种主要方法:一是应用未完全减毒的中等毒力活疫苗,其主要目的是提供足够强的免疫刺激以使免疫鸡产生对强毒和超强毒株的保护作用。然而,这些中等毒力活疫苗本身也可能会造成免疫抑制并干扰其它疫苗的免疫作用。另一种有效方法是采用灭活疫苗,但这种灭活疫苗必需具有相当高的病毒抗原滴度才有作用。在高感染区一个最有效的灭活疫苗是用感染的法氏囊制备抗原,这种抗原的制备必需用超强 IBDV 毒株感染鸡,然后宰杀感染鸡从法氏囊中提取所需抗原。这一过程需要屠宰大量鸡因而生产成本很高。

近年来由于基因克隆和重组技术的日益完善和实用化,许多科学家研究开发了许多不同的实验性重组 IBD 疫苗。这些疫苗多是以病毒为活载体的疫苗。主要载体病毒有: fowl poxvirus, herpevirus of turkey, fowl adenovirus, Marek's disease virus, 和 Semliki Forest virus。此外,还有编码 VP2 基因的 DNA 疫苗的报道,以及用酵母表达系统生产 IBD 亚单位疫苗的报道。

发明内容:

本发明的目的在于提供一种 *Escherichia coli* BL21/pBV220-VP2 菌种和用该菌种生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法。

本发明的技术方案是：

1、总 RNA 的提取：

总 RNA 使用上海生工 UNIQ-10 Trizol RNA 提取试剂盒进行。简要过程如下：法氏囊取自 IBD 病死鸡，研磨和匀浆。将细胞冻融 3 次。取 50 毫克组织匀浆置于一只聚乙烯离心管中，室温下加入 0.5 毫升 Trizol 试剂。加盖密封并剧烈振荡 15 秒。加氯仿/异戊醇 100 微升，剧烈振荡 30 秒。置 4℃ 条件下 12,000rpm 离心 15 分钟。将上层水相的无色水溶液转入另外一只无 RNA 酶的离心管中，每 450 微升液体加无水乙醇 150 微升温和振摇。将整个溶液转入 UNIQ-10 柱和收集管中。室温放置 2 分钟。室温下 12,000rpm 离心 1 分钟。将柱从收集管中取出，弃去收集管中废液。将柱重新放入同一收集管中。加入 450 微升 RW 液于 UNIQ-10 柱中，室温放置 2 分钟。室温 12,000rpm 离心 1 分钟。从收集管中取出柱，弃去收集管中的废液，将柱放入同一个收集管中。重复前一步骤一次。将柱在 12,000rpm 下离心 1 分钟。将柱转入无 RNA 酶的离心管中。加 50 微升 DEPC 处理过的无 RNA 酶的水于柱中央的膜上，70℃ 保温 2 分钟。将管置 12000rpm 下离心 1 分钟。离心管中的溶液就是法氏囊和 IBDV 的总 RNA。

2、VP2 基因克隆：

根据 VP2 基因 5' 和 3' 末端的保守区序列合成寡聚核苷酸引物，每个引物的 5' 端包含一个方便将基因克隆到载体上的限制酶切位点。这对引物被用来进行 RT-PCR 扩增产生 cDNA。取总 RNA 液 8 微升，加 1 微升 40 μ mol/L 反向引物 70--80℃ 变性 5 分钟，立即冰浴 3 分钟。随后依次加入 4 μ l M-MLV 5×RT buffer, 5

μl 4mmol/L dNTPs, 40u Rnasin, 200u M-MLV, 混合, 离心, 加入到 RNA 标本管中, 每管 11 微升, 使总体积达 $20\mu\text{l}$, 离心数秒钟后, 37°C 水浴 1 小时, 95°C 10 分钟灭活反转录酶。

cDNA 的 PCR 扩增: $10\mu\text{l}$ cDNA 液, $5\mu\text{l}$ $10\times$ Ex Taq 缓冲液, 4 单位 TaKaRa EX Taq(一种高保真 DNA 聚合酶, 同时能在扩产物末端给出一个额外 A 用于 T 载体连接), 两种 $40\mu\text{mol}$ 引物各 $0.5\mu\text{l}$ 。 $4\mu\text{l}$ dNTP 混合液 (每管 2.5mM), 总体积为 $50\mu\text{l}$ 。 PCR 温度循环程序为: 94°C , 5 分钟; (94°C 60 秒, 64°C 120 秒, 72°C 120 秒) 循环 35 次; 72°C , 10 分。用 1%琼脂糖凝胶电泳分离扩增片段, 相应的核酸带被切下, 并用小量胶提取试剂盒进行纯化。分离的 VP2 片段被连接到 pMD18-T 载体上构建成 pMD-VP2 质粒。用该质粒转化 *Escherichia coli* DH5 α , 生长在含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LBG 板上的白色菌株被分离出来。提取质粒 DNA, 用限制性内切酶和 PCR 法分析 VP2 的存在和连接方向。

3、表达载体的构建:

将 pMD-VP2 质粒中的 VP2 基因片段用限制性内切酶切下, 用琼脂糖凝胶电泳后胶回收的方法进行回收。然后亚克隆到线性化的 pBV220 载体上, 线性化的过程使用相同的限制性内切酶。新质粒命名为 pBV220-VP2。将它用来转化 *Escherichia coli* BL21。转化菌通过测序进行鉴定。

4、大肠杆菌中的表达过程:

挑取大肠杆菌 BL21/pBV220-VP2 菌单菌落, 接种于 10ml 的 LB+AMP 培养液中, 29°C 发酵罐中培养至 $\text{OD}_{600}=0.8-0.9$ 。将温度升至 42°C 再诱导培养 3 小时。取出后 5000rpm 离心 10 分钟。将菌体沉淀重悬于 1/10 体积 (1ml) 的细菌裂解液中。加溶菌酶至 $100\mu\text{g/ml}$, 同时加入 1/10 体积的 TritonX-100, 37°C 保温 1 小时。

反复冻融 3 次,用超声波细胞破碎器处理剪切 DNA 至溶液不再粘稠。4℃, 12,000g 离心 15 分钟,分离可溶部分和不溶部分。对可溶部分中的 VP2 表达蛋白进行抗原活性和蛋白电泳检查,表明这种表达蛋白是可溶性具有抗原活性的非融合蛋白。

5、疫苗的制备:

IBD 基因工程亚单位油乳剂疫苗制备:将含有 VP2 表达蛋白的溶菌液上清用 20-45%饱和度的硫酸铵进行沉淀。收集沉淀重溶于适量的 PBS 液中,转入透析袋中对 PBS 进行透析。将溶液稀释至 VP2 的 AGP 抗原滴度为 1/32。按 1 份 VP2 蛋白液加 2 份油乳剂,进行分散处理制成油乳剂疫苗。

IBD 亚单位油乳剂的制备:矿物油:司本-80=9:1,充分混匀后加入 4%吐温-80, 2%硬脂酸铝,充分混合,高压蒸汽灭菌后备用。

鸡传染性法氏囊病 (IBD) 基因工程活菌载体疫苗制备:大肠杆菌 BL21/pBV220-VP2 经过步骤 4 诱导后,不进行细胞破碎,将菌体沉淀重悬于适量疫苗稳定剂中,在冷冻干燥机中进行冷冻干燥处理,-20℃保存备用。

IBD 中等毒力活疫苗 B87 的准备:IBD 活疫苗系中国杭州荐量兽用生物制品有限公司生产,按说明书要求用灭菌生理盐水稀释后备用。

6、免疫实验:

(1) 试验鸡 从荆州康尔美种鸡场购买 100 只 1 日龄艾维因商品肉仔鸡。第 18 日龄时,对每只鸡采血,以琼脂凝胶免疫扩散试验 (AGP) 检测母源抗体。剔除母源抗体阳性鸡,将母源抗体阴性鸡随机分成 5 组,分别为 A、B、C、D、E 组。

(2) 接种方法 均为肌肉注射。

(3) 分组及免疫接种

表 1 鸡免疫实验分组及免疫接种

| 组别 | 接种疫苗类型 | 第一次接种 | | 第二次接种 | |
|----|------------------|-------|------------|-------|------------|
| | | 只数 | 剂量 (ml) | 只数 | 剂量 (ml) |
| A | 阴性空白组 | 6 | — | 6 | — |
| B | 阳性空白组 | 17 | — | 17 | — |
| C | IBD 基因工程活菌载体疫苗 | 13 | 0.1 | 13 | 0.1 |
| D | IBD 基因工程亚单位油乳剂疫苗 | 11 | 0.3 | 11 | — |
| E | IBD 中等毒力活疫苗 | 6 | 0.1 | 6 | 0.1 |

(4) 攻毒试验

IBDV 强毒株 BC 6/85, 购自中国兽药监察所, 用 2×10^4 鸡胚半数感染量 (EID₅₀) /ml 攻毒时, 每只鸡肌肉注射 0.1ml, 第二次免疫接种 10 天后攻毒。

(5) 免疫效果确定依据

攻毒后第 10 天剖杀试验鸡。检查法氏囊, 并观察其外观色泽。取一部分法氏囊作组织切片, 以观察组织学病理变化。法氏囊组织学异常变化分析依据, 见表 2。

表 2 IBDV 感染后法氏囊损伤组织学评分系统

| 损伤评分 | 组织学特性 |
|------|----------------------------|
| 0 | 法氏囊的任何淋巴滤泡均无损伤, 髓质和皮质界限清楚。 |

| | |
|---|-------------------------|
| 1 | 偶见淋巴滤泡轻微坏死，法氏囊整体结构维持正常。 |
| 2 | <50%的淋巴滤泡有严重的淋巴细胞损耗 |
| 3 | >50%的淋巴滤泡有严重的淋巴细胞损耗 |
| 4 | 仅有淋巴滤泡的轮廓存在，结缔组织增生，囊腔化。 |
| 5 | 整个淋巴滤泡结构丧失，纤维化。 |

(6) 免疫接种后鸡体内抗 IBDV 抗体产生情况：见表 3。

表 3 实验鸡体内抗 IBDV 抗体 AGP 检测结果

| 组别 | 接种疫苗类型 | 鸡只数 (只) | 抗体阳性数 (只) | 抗体阳性率 (%) |
|----|------------------|------------|--------------|-----------|
| A | 阴性空白组 | 6 | 0 | 0 |
| B | 阳性空白组 | 17 | 0 | 0 |
| C | IBD 基因工程活菌载体疫苗 | 13 | 11 | 84.6 |
| D | IBD 基因工程亚单位油乳剂疫苗 | 11 | 11 | 100.0 |
| E | IBD 中等毒力活疫苗 | 6 | 2 | 33.3 |

(7) 攻毒后第 10 天实验鸡的法氏囊组织学检查结果 表 4

表 4 组织学检查法氏囊损伤评分结果

| 组别 | 疫苗 | 数量 | 实验鸡法氏囊损伤评分数 | | | | | | 保护率 (%) |
|----|------|----|-------------|---|---|---|---|---|---------------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| A | 阴性空白 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |
| B | 阳性空白 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 9 | 0/17 (0.0) |

| | | | | | | | | | |
|---|------------------|----|---|---|---|---|---|---|------------------|
| C | IBD 基因工程活菌载体疫苗 | 13 | 4 | 9 | 0 | 0 | 1 | 0 | 13/13 (100.0) |
| D | IBD 基因工程亚单位油乳剂疫苗 | 11 | 6 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 10/11 (90.9) |
| E | IBD 中等毒力活疫苗 | 6 | 0 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2/6 (33.3) |

0、1分代表被保护，2、3、4、5分代表法氏囊受到不同程度损伤，损伤程度随分增加而加重，均代表未受有效保护。详见表2。

此次免疫保护实验结果：IBD 基因工程活菌载体疫苗保护率为 100%；IBD 基因工程亚单位油乳剂疫苗保护率 90.9%，商品疫苗 33.3%。

7、IBD 基因工程检测用抗原制备：大肠杆菌 BL21/pBV220-VP2，经前述方法诱导表达后，进行细胞破碎，收集溶菌液上清，在 20-45%饱和度下进行硫酸铵沉淀，然后通过 sephadex G100 分子筛层析，DEAE 纤维素离子交换层析，羟基磷灰石吸附层析后得到纯化 VP2 蛋白。该蛋白作为基因工程抗原可直接用于 AGP 和 ELISA 检测 IBD 抗体。商品化可加稳定液后冷冻保存，或将纯蛋白液在冷冻干燥机中冻干冷藏。

本发明具有以下优点和积极效果：

(1) 本菌种能稳定可靠的表达 IBDV VP2 蛋白。该表达产物为胞液中可溶性蛋白，具有天然 VP2 蛋白的抗原活性，生产成本较低。

(2) 该菌种可用来生产基因工程亚单位疫苗和基因工程活菌载体疫苗，用于 IBD 的预防。

(3) 将表达的 VP2 蛋白纯化后可作为基因工程抗原用于 ELISA 的标准抗原制

备，或 AGP 等其它标准抗原的制备。

中国典型培养物保藏中心用于专利程序的培养物保藏受理通知书（收据）：

分类命名 *Escherichia coli* BL21/pBV220-VP2

保藏日期 2004 年 5 月 24 日

保藏单位 中国 武汉 武汉大学 邮编 430072

保藏编号 CCTCC NO: M204037

具体实施方式：

将编码 IBDV 超强毒株的 VP2 基因连接到 pBV220 质粒上构成表达质粒 pBV220-VP2，转化 *Escherichia coli* BL21，得到基因工程菌种 *Escherichia coli* BL21/pBV220-VP2。该菌种可用于基因工程亚单位疫苗的生产，为 IBD 的预防提供一个新方法。该菌种还可用来生产 VP2 基因工程抗原，该抗原可用于检测鸡血清中抗 IBD 抗体。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种用大肠杆菌生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1847392A | 公开(公告)日 | 2006-10-18 |
| 申请号 | CN200510064273.3 | 申请日 | 2005-04-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 长江大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 长江大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 长江大学 | | |
| [标]发明人 | 荣俊 程太平 刘晓娜 杨待建 | | |
| 发明人 | 荣俊 程太平 刘晓娜 杨待建 | | |
| IPC分类号 | C12N1/21 A61K39/12 A61P31/14 G01N33/53 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一种用于鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗生产的菌种和用该菌种生产鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗的方法，该菌种的特征是：Escherichia coli BL21/pBV220 - VP2，CCTCC NO：M204037；该菌种的构建过程是从分离的传染性法氏囊病超强毒株中克隆出VP2基因，将它插入pBV220质粒上构建成原核表达质粒，用该表达质粒转化大肠杆菌BL21菌种；通过热诱导的方法使Escherichia coli BL21/pBV220 - VP2菌种表达VP2蛋白后，经过适度纯化后可加入油乳剂制成油乳剂疫苗。此疫苗可用于肉用仔鸡、蛋鸡、种鸡预防传染性法氏囊病。该疫苗不造成对鸡法氏囊的损伤，不影响其它疫苗的免疫效果，也没有引起病源扩散的危险。

| 组别 | 接种疫苗类型 | 第一次接种 | | 第二次接种 | |
|----|------------------|-------|---------|-------|---------|
| | | 只数 | 剂量 (ml) | 只数 | 剂量 (ml) |
| A | 阴性空白组 | 6 | — | 6 | — |
| B | 阳性空白组 | 17 | — | 17 | — |
| C | IBD 基因工程活菌载体疫苗 | 13 | 0.1 | 13 | 0.1 |
| D | IBD 基因工程亚单位油乳剂疫苗 | 11 | 0.3 | 11 | — |
| E | IBD 中等毒力活疫苗 | 6 | 0.1 | 6 | 0.1 |