

# 幼畜腹泻双价基因工程疫苗(K88、K99)

## 抗原蛋白的生产工艺

顾大年 巫爱珍 徐安清 蒋浩波 仲毅毅 孙玉昆

(中国科学院上海生物工程中心, 上海)

本文报道了在幼畜腹泻双价基因工程菌(K88、K99)的高密度发酵和抗原蛋白基因过量表达的研究基础上生产抗原蛋白疫苗的工艺。高密度发酵的工程菌(K88、K99)发酵液经65℃保温处理、离心除去菌体,清液部分含发酵液中抗原量的80%,加聚乙二醇(至最终浓度为7%)沉淀可回收全部抗原蛋白,加消毒的生理盐水溶解及稀释后分装冻干制成抗原蛋白疫苗。疫苗的组成份主要有分子量为52、36、22、18kd的蛋白。此法制备的双价疫苗不经甲醛处理,保持了抗原蛋白的天然空间结构,因此用其免疫怀孕的母猪、分娩后母猪乳汁中含有较高效价的抗体,能中和肠毒素大肠杆菌,有效地保护了仔猪黄痢的危害。

**关键词** K88、K99 基因工程疫苗

分泌肠毒素的大肠杆菌感染幼畜(仔猪、小牛等)引起急性腹泻死亡在世界各地均有发生<sup>[1-4]</sup>,对怀孕母猪注射K88、K99疫苗后,分娩后母猪初乳中含有的抗体能有效地阻止产生肠毒素大肠杆菌在幼畜小肠表面附着繁殖,从而防止产肠毒素大肠杆菌引起的腹泻<sup>[5-8]</sup>。前文已经报道了幼畜腹泻双价基因工程疫苗(K88、K99)的高密度发酵工艺、抗原蛋白基因的过量表达,在此基础上进一步研究了抗原蛋白的生产工艺和疫苗的抗原蛋白组成,由于这种抗原蛋白疫苗不需甲醛处理,因而保持了蛋白的空间结构,对于提高产品(疫苗)质量、保证安全、促进免疫抗体的产生和延长疫苗的贮藏时间等均是十分有利的。本项工作的DNA重组、表达等上游工作由中国科学院上海植物生理所洪孟民教授<sup>[9,10]</sup>完成后转移至中科院上海生物工程中心进行中试研究。

## 材料与方 法

### (一) 材料

1. 寄主菌株和质粒:大肠杆菌C600及含K88、K99抗原蛋白基因的pTK88-99-8质粒由洪孟民教授提供。

2. M9培养基组成及K88、K99基因工程菌的发酵: M9培养基组成(%): NH<sub>4</sub>Cl 0.1, NaCl 0.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 葡萄糖0.4、蛋白胨0.5, 发酵罐为16L, 美国New Brunswick Microgen Fermenter, 发酵参数见前文<sup>[12]</sup>。

3. K88、K99基因工程菌的菌种保存: 含K88、K99抗原基因质粒C600大肠杆菌于15%甘油中在-80℃下保存。

### (二) 方法

1. K88、K99抗原蛋白的纯化及相应抗体的制备: 产生K88抗原蛋白的野生株大肠杆菌青3株(K88<sup>+</sup>, LT<sup>+</sup>, ST<sup>+</sup>)及产生K99抗原蛋白的大肠杆菌K12-K99<sup>+</sup>分别接种于M9培养基中于37℃培养过夜,离心收集菌体,将菌体悬浮于0.1

本文于1989年8月22日收到。

本项目系国家七·五项目,由国家科委资助。

mol/L Tris-1.0mol/L NaCl缓冲液中, pH7.5, 置于60℃水浴中保温 5 min, 使伞毛脱落, 离心除去菌体, 上清液加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至60%饱和度, 于4℃下放置过夜, 离心取沉淀, 溶于含 2.0mol/L 尿素-0.1 mol/L Tris-Cl缓冲液中, pH7.5, 经 Sepharose 4B(2 × 80cm) 柱层析分离, 分别得K88、K99 抗原蛋白, 将纯化的K88、K99 抗原蛋白加入福氏完全佐剂按常规方法免疫家兔制备抗体。

2. K88、K99 抗原及抗体的效价测定<sup>[11]</sup>: 利用K88、K99的抗原蛋白或抗体分别致敏红血球, 将抗原或抗体分别进行系列二倍稀释法测定致敏红血球的凝集反应。

3. 应用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定K88、K99 抗原蛋白的分子量: SDS-聚丙烯酰胺凝胶板的浓缩胶为 4%, 分离胶为12%, 蛋白分子量标准为磷酸化酶B(94kd), 血清白蛋白(67kd), 肌动蛋白(43kd), 碳酸酐酶(30kd) 及烟草花叶蛋白外壳蛋白(17.5kd)。按常规方法进行电泳。

7. K88、K99 抗原蛋白疫苗的安全性及有效性试验: 将 K88、K99 抗原蛋白疫苗 0.5mg, 临产前 21 天免疫怀孕母猪, 分娩后测定母猪初乳中的 K88、K99抗体变化, 按体重计算以注射怀孕母猪的抗原量的300—500倍的剂量注射小白鼠, 用30—50倍剂量的抗原注射家兔, 观察一个月有无不良反应产生。

## 结 果

### (一) K88、K99 抗原蛋白疫苗的生产工艺

在16L的发酵罐中装入16L的培养液, 按前文<sup>[12]</sup>所述发酵条件进行高密度发

酵, 发酵毕在搅拌条件下升温至65℃保温 30min, 3000rpm 离心 30min除去菌体, 取上清液加聚乙二醇6000至 7%, 搅拌至聚乙二醇全部溶解后在 4℃下放置过夜, 4000rpm离心 20min, 收集沉淀溶于灭菌生理盐水中, 分装冻干, 每瓶含抗原蛋白 0.5mg, 制备抗原蛋白疫苗的工艺流程如图 1 所示。

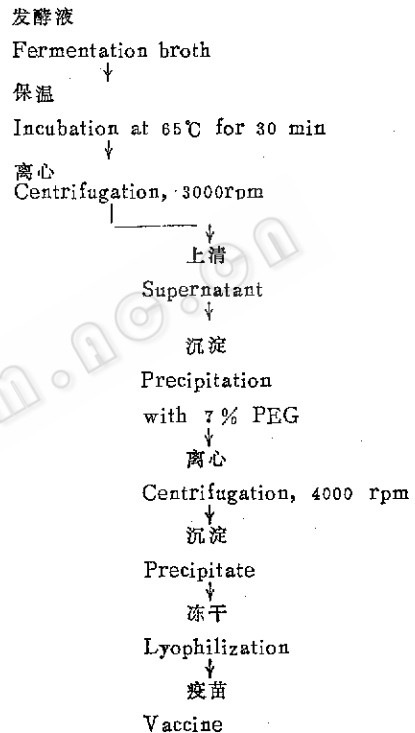


图1 K88、K99 幼畜腹泻疫苗蛋白抗原的生产工艺流程

Fig.1 Schematic diagram of the production of the protein antigen of diarrhea vaccine of K88, K99

工艺过程中抗原蛋白的分布如表 1 所示, K88、K99 抗原蛋白除装配伞毛之外, 发酵液中含有大量游离的抗原蛋白, 经65℃保温处理后菌体伞毛中的K88抗原效价为  $2^8 = 256$ , 而发酵液中抗原K88效价为  $2^{10} = 1024$  即 80% 的抗原蛋白分布在上清液中, 菌体中所含抗原占20%, 经聚乙二醇沉淀, 抗原蛋白可以全部回收, 说明这一工艺路线是切实可行的, 但应指出

如果不是高密度发酵和抗原蛋白过量表达, 生产抗原蛋白疫苗是不经济的。

## (二) 抗原蛋白疫苗的有效性与安全性

表 2 结果是应用抗原蛋白疫苗免疫的

表 1 K88、K99 抗原蛋白的分布

Table 1 Distribution of the protein antigen of K88, K99

	抗原效价 Titers of antigens	
	K88	K99
发酵液 Fermentation broth		
Supernatant	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>
Cell pellet	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>
保温处理 After incubation at 65°C		
Supernatant	2 <sup>10</sup>	2 <sup>10.5</sup>
Cell pellet	2 <sup>8</sup>	2 <sup>10.5</sup>
沉淀 Precipitation		
Supernatant	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>
Precipitate	2 <sup>14</sup>	2 <sup>14</sup>

表 2 免疫母猪乳汁中的抗体

Table 2 Antibody to K88, K99 in the milk of immunized mother pig

分娩后天数 Days after child birth	效价 Titers of antibody				
	K88			K99	
First day	2 <sup>9.5</sup>	2 <sup>8.5</sup>	2 <sup>7.5</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>10.5</sup>
Second day	2 <sup>6.5</sup>	2 <sup>6.5</sup>	2 <sup>7.5</sup>	2 <sup>6.5</sup>	2 <sup>8.5</sup>
Third day	2 <sup>4.5</sup>	2 <sup>4.5</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>4.5</sup>	2 <sup>8.5</sup>

怀孕母猪的初乳中表现出对抗原 K88、K99 的高效价抗体, 有效地保护仔猪不受产肠毒素大肠杆菌的危害。另外按体重计算取 300—500 倍母猪所用剂量注射小白鼠或 30—50 倍剂量注射家兔, 经过一个月的观察均未发现任何不良影响, 表明了抗原蛋白疫苗的安全性。

## (三) 抗原蛋白疫苗的组成

抗原蛋白的 SDS-PAGE 分析(图版 I) 表明寄主菌 C600 的伞毛组成除了 60kd, 32kd 主要蛋白组份之外还有其他微量蛋白组份。双价基因工程菌 K88、K99 伞毛抗原蛋白组成与寄主菌相同组份为 60kd, 32kd 外主要蛋白组份为 52kd, 36kd, 22kd, 18kd 还有其他微量组份。

## 讨 论

产肠毒素的大肠杆菌通过细菌表面的伞毛附着在幼畜(仔猪、小牛)的小肠表面进行繁殖并分泌肠毒素引起急性腹泻死亡, 伞毛中具有附着作用的蛋白又称粘着性蛋白, K88、K99 双价基因工程疫苗系将二种粘性蛋白基因克隆在一个质粒中表达, 寄主菌不产生肠毒素, 通过高密度发酵和抗原基因的过量表达, 伞毛抗原经过 65°C 热处理脱落与发酵液中未装配的游离抗原蛋白都存在于发酵液中, 因而为生产抗原蛋白疫苗提供了基础, 经过这样处理 80% 的 K88、K99 抗原蛋白存在于离心除去菌体的发酵液中, 再经聚乙二醇沉淀可以全部回收, 工艺路线是切实可行的, 但应指出没有上述的高密度发酵和抗原蛋白基因的过量表达, 制备抗原蛋白疫苗是不经济的。这样制备的疫苗不含菌体, 不需要甲醛处理, 抗原蛋白保持了天然空间结构, 有利于诱导产生抗体, 并且冻干制剂可以长期保存, 对于贮藏和运输十分有利, 这就是本制剂的优点所在, 解决了疫苗生产中所谓的“冷链”即贮存、运输每个环节都要保持低温的问题。

## 参 考 文 献

- [1] Smith, H. W. and Linggood, M. A., *J. Medical Microbiology*, 4:467—485, 1974.
- [2] Gaastra, W. and De Graf, K., *Microbiological Reviews*, 46:129—161, 1982.
- [3] Frits, K. D. et al., *Infection and Immunity*, 33:877—883, 1980.
- [4] Frits, K. M. et al., *J. Bact.*, 150:512—521, 1982.
- [5] Van Emden, J. D. A. et al., *Infection and Immunity*, 24:1125—1133, 1980.
- [6] Shipley, P. L. et al., *J. Bact.*, 145:920—925, 1981.
- [7] Kehoe, M. et al., *FEMS Letters*, 74:123—132, 1982.
- [8] Kehoe, M. et al., *Nature*, 291:122—126, 1981.
- [9] 洪孟民等: 生物工程学报, 1(2):36—45, 1985.
- [10] 张景六等: 生物工程学报, 1(2):34—40, 1985.
- [11] 北京医学院微生物教研组: 实验免疫学, 人民卫生出版社, p.412, 1980.
- [12] 孙玉昆等: 生物工程学报, 6(2):96—101, 1990.

## Technology of the Production of the Protein Antigens of K88、K99 Diarrhea Vaccine

Gu Danian Wu Aizhen Xu Anqing Jang Hopo Zhong Yiyi Sun Yukun  
(Shanghai Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

This paper described that the technology of production of the protein antigens of diarrhea vaccine of K88、K99 by the high cell density fermentation and antigens over expression. The fermentation broth was heated at 65°C for 30 minutes and then removed the cells by the centrifugation. The supernatant containing about 80 percent of the antigen proteins in the broth was precipitated completely with 7% polyethelene glycol. The precipitate of protein antigens was collected and lyophilized. The protein antigens of K88、K99 obtained by this methods keeps its natural three dimensional structure without treatment with formalin. This is more favorable for the inducing of the production of the antibody, safty, storage and transportation. The protein components of the vaccine showed that the majority of the protein antigen with the molecular weight of 52, 36, 22 and 18kd.

### Key word

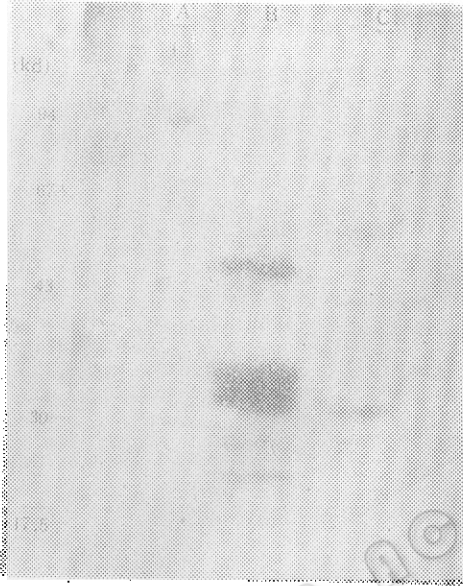
Protein antigen of K88、K99 diarrhea vaccine

顾大年等：幼畜腹泻双价基因工程疫苗(K88、K99)抗原蛋白  
的生产工艺

图版 I

Gu Danian et al., Technology of the production of the protein  
antigens of K88, K99 diarrhea vaccine

Plate I



K88、K99免疫疫苗蛋白组成

The protein components of the vaccine of K88, K99

A. Markers of protein, B. Vaccine, C. Proteins of C600

周健明等：绛红色小单胞菌噬菌体启动子在大肠杆菌中的克隆和表达

图版 I

Zhōu Jianming et al., Cloning and expression of promoter of  
phage Mphi attacking *Micromonospora purpurea* in  
*Escherichia coli*

Plate I

