



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103421832 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 04

(21) 申请号 201210516113. 8

C12N 1/21 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 12. 04

C07K 14/195 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

C07K 16/12 (2006. 01)

CCTCC NO :M208128 2008. 09. 10

C07K 16/02 (2006. 01)

CCTCC NO :M2012370 2012. 09. 21

A61K 31/165 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

(71) 申请人 武汉市畜牧兽医科学研究所

C12R 1/19 (2006. 01)

地址 430208 湖北省武汉市江夏区金口街长山村纸金路长山 2 号

(72) 发明人 叶胜强 钱运国 冉志平 陈洁

王丽霞 喻婷 邓兵 杨宇 周华

童新红 龚萍

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 张红兵

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页

序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

包含氟苯尼考耐药基因蛋白的卵黄抗体及制备与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种包含氟苯尼考耐药基因蛋白 (F1oR) 的卵黄抗体及其制备方法与应用。从临床病死鸭分离氟苯尼考耐药鸭疫里默氏杆菌 (CCTCC NO :M208128), 采用 PCR 扩增耐药基因 (f1oR) 部分片段, 并克隆到表达质粒 pET28a (+) 上, 转染宿主菌 BL21 (DE3)。该重组菌株经诱导表达, 制备了带 HIS 标签的含目的基因片段的融合蛋白, 该融合蛋白以包涵体形式存在, 提取该包涵体, 制备免疫原。将该免疫原免疫开产蛋鸡, 获得了能有效提高耐药菌株对氟苯尼考敏感性的卵黄抗体, 该卵黄抗体与氟苯尼考联合应用, 能显著提高鸭疫里默氏杆菌耐药菌株感染鸭的治疗效果。由于其他氟苯尼考耐药菌株也主要由 f1oR 基因介导, 因此, 该卵黄抗体也可用于兽医临床上畜禽氟苯尼考耐药菌株感染的治疗。

1. 一种分离的适用于制备抗氟苯尼考耐药蛋白的卵黄抗体的重组蛋白的质粒,其包含有序列表 SEQ ID NO:1 所示的核酸序列。
2. 一种表达抗氟苯尼考耐药蛋白的重组大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21/pET-28a(+)-f1oR, 其含有权利要求 1 所述的质粒, 包含该质粒的大肠杆菌 BL21/pET-28a(+)-f1oR 保藏在中国典型培养物保藏中心, 其保藏号为 CCTCC NO:M2012370。
3. 一种适用于制备抗氟苯尼考耐药蛋白抗体的重组蛋白, 其是由保藏号为 CCTCC NO:M2012370 的大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21/pET-28a(+)-f1oR 所表达的, 其氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO:2 所示。
4. 一种抗氟苯尼考耐药蛋白的卵黄抗体的制备方法, 其特征在于, 克隆 f1oR 基因的片段, 该片段的核酸序列如序列表 SEQ ID NO:1 所示, 将该核酸片段插入到原核表达质粒 pET-28a(+) 的 BamH I 与 Xho I 酶切位点, 转染大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 而获得, 包含该质粒的大肠杆菌 BL21/pET-28a(+)-f1oR 保藏在中国典型培养物保藏中心, 其保藏号为 CCTCC NO:M2012370。
5. 权利要求 2 所述的重组大肠杆菌在制备抗氟苯尼考耐药蛋白的卵黄抗体制品中的应用。
6. 权利要求 3 所述的重组蛋白在制备抗氟苯尼考耐药蛋白的卵黄抗体制品中的应用。
7. 权利要求 4 所述方法的应用, 其特征在于, 将抗氟苯尼考耐药蛋白的重组蛋白的卵黄抗体与氟苯尼考协同用于治疗畜禽氟苯尼考耐药菌株的感染。

## 包含氟苯尼考耐药基因蛋白的卵黄抗体及制备与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物制品和畜禽疾病防控技术领域。具体涉及一种抗氟苯尼考耐药基因蛋白(FloR)的卵黄抗体、其制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 氟苯尼考是一种广谱、高效,动物专用抗菌药。中国也在1999年批准该药上市,已广泛用于治疗牛、猪、鸡、鸭及鱼类的细菌性疾病。但随着用药的增多,临床上细菌对此药的耐药性问题也日渐突出,耐药率逐年升高。近年来,由于鸭场广泛使用该药,使得鸭疫里默氏杆菌和致病性大肠杆菌对其耐药的问题非常严重。

[0003] 细菌对氟苯尼考耐药主要由floR基因介导,携带floR基因的菌株对氟苯尼考高度耐药(Singer R, Patterson S, Meier A, Gibson J, Lee H, Maddox C. Relationship between phenotypic and genotypic florfenicol resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2004, 48:4047 - 4049),且氟苯尼考耐药菌株中基本上可检测到floR基因。自Kim等首次从鱼巴氏杆菌质粒中发现氟苯尼考耐药基因以来(Kim E, Aoki T. Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R-plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiology Immunology*, 1996, 40:665-669),相继从沙门氏菌、大肠杆菌、波氏杆菌、鸭疫里默氏杆菌等病原菌中克隆到floR基因,且这些菌株携带的floR基因高度同源。

[0004] floR基因主要存在于细菌质粒中,部分存在于染色体上。floR基因转录、翻译的蛋白FloR蛋白位于菌体细胞膜中,含有12个疏水跨膜区,属于主要易化子(MF)超家族。FloR蛋白为氯霉素类(氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考)药物特异的转运泵,通过质子动力介导药物从菌体内外排(Braibant M, Chevalier J, Chaslus-Dancla E, Pagès J, Cloeckaert A. Structural and functional study of the Phenicol-specific efflux pump FloR belonging to the major facilitator superfamily. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2005, 49:2965 - 2971)。Du等将floR基因的开放读码框和启动子克隆到pGEM-T载体中,通过质粒转化构建的floR基因重组大肠杆菌能显著抑制氟苯尼考在胞内聚集(Du X, Xia C, Shen J, Wu B, Shen Z. Characterization of florfenicol resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 236:183 - 189)。

[0005] 另外,检索到Wu等发表文献与本发明主题相关,该文献将floR基因部分基因片段插入pGEX-4T-2原核表达载体,经诱导表达后获得了含谷胱甘肽-S-转移酶(GST)标签的融合蛋白,再将纯化的融合蛋白免疫小鼠,获得了多克隆抗体,该抗体与氟苯尼考耐药大肠杆菌共孵育,可抑制该耐药菌对氟苯尼考的外排(Wu B, Xia C, Du X, Cao X, Shen J. Influence of anti-FloR antibody on florfenicol accumulation in florfenicol-resistant *Escherichia coli* and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of florfenicol-resistant *E. coli* isolates. *Journal of Clinical*

Microbiology, 2006, 44:378 - 382)。该文献说明了针对 f1oR 蛋白的抗体能够使其功能失活,从而提高氟苯尼考耐药菌株对氟苯尼考的敏感性。但该文献的融合蛋白 GST 标签分子量较大(约 26kd),而目的基因片段对应的蛋白较小(约为 8kd),GST 标签的存在干扰了目的蛋白诱导抗体的产生。本发明采用的表达载体是 pET-28a(+),经诱导表达后获得了含组氨酸标签(HIS)融合蛋白, HIS 标签的分子量较小,约为 6kd,利于目的蛋白诱导抗体的产生。特别地,该文献未涉及氟苯尼考耐药蛋白(F1oR 蛋白)卵黄抗体的制备及其在动物疾病防控中的重要应用。

[0006] 基于以上的发现,我们利用 PCR 技术扩增 f1oR 基因片段,并构建表达携带短标签融合蛋白的重组菌株,该融合蛋白以包涵体形式存在,经过简单纯化,直接以包涵体形式制备免疫原,免疫蛋鸡制备卵黄抗体,并将该卵黄抗体应用于临床上畜禽氟苯尼考耐药菌株感染的治疗。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于构建表达 f1oR 基因的重组菌株,获得一种免疫原性更好的重组蛋白抗原。

[0008] 本发明的第二个目的是制备一种特异性卵黄抗体,它能有效提高氟苯尼考耐药菌株对氟苯尼考的敏感性。并提供一种制备抗氟苯尼考耐药基因蛋白(F1oR)特异性卵黄抗体的方法。

[0009] 本发明的第三个目的是制备的抗氟苯尼考耐药基因蛋白(F1oR)特异性卵黄抗体在兽医临床上的应用,用于畜禽氟苯尼考耐药菌株感染的治疗,提高氟苯尼考的治疗效果。

[0010] 本发明是通过以下技术方案实现:

[0011] 一种表达含 f1oR 基因部分基因片段的重组菌株是将 PCR 扩增获得的 f1oR 基因部分基因片段(其核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO:1 所示)插入到原核表达载体 pET-28a(+)的 BamH I 与 Xho I 酶切位点,转染大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21 而获得,该菌株被命名为大肠杆菌 BL21/pET-28a(+)-f1oR, *Escherichia coli* BL21/pET-28a(+)-f1oR, 已于 2012 年 9 月 25 日递交中国·武汉·武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,其保藏号为 CCTCC NO:M2012370。

[0012] 申请人获得一种含 f1oR 基因部分基因片段(其核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO:1 所示)的融合蛋白,是由保藏号为 CCTCC NO:M2012370 的大肠杆菌所表达的产物。

[0013] 本发明的技术方案如下:

[0014] 下列技术步骤中涉及到基因克隆及表达部分未经特别说明的方法均参照《分子克隆实验指南》第三版(J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔等著,黄培堂等译,北京:科学出版社,2002 年)。

[0015] 一、表达 f1oR 基因部分基因片段的重组质粒的构建

[0016] 根据 NCBI 数据库中已报道的 f1oR 基因序列(登录号:NC\_012692)设计带有限制性内切酶酶切位点的引物。以临床上分离的对氟苯尼考耐药的鸭疫里默氏杆菌(该菌株命名为:鸭疫里默氏杆菌 RA-1, *Riemerella anatipestifer* RA-1, 已于 2008 年 9 月 10 日递交中国典型培养物保藏中心保藏,保藏号为 CCTCC NO:M208128)的质粒为模板,通过 PCR 扩增的方法获得 f1oR 基因部分基因片段,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所述。

[0017] 将用琼脂糖凝胶电泳纯化回收的 PCR 扩增产物经 BamH I 与 XhoI 酶切后,与用同样酶切的表达载体 pET28a(+) 质粒连接,获得原核表达质粒(或称重组质粒),将该重组质粒命名为 pET-28a(+)-f1oR。

[0018] 二、融合蛋白的诱导表达及提取

[0019] 将测序正确的重组质粒 pET-28a(+)-f1oR,转化至大肠杆菌 BL21 中,构建重组大肠杆菌菌(Escherichia coli) BL21/pET-28a(+)-f1oR,并利用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)进行诱导表达。通过对 Escherichia coli BL21/pET-28a(+)-f1oR 表达产物的可溶性分析发现:诱导表达产物以包涵体形式存在,采用超声波破碎法提取所述的包涵体,该包涵体经 3 次洗涤后,离心收集,冻干保存。

[0020] 三、卵黄抗体的制备工艺

[0021] 将冻干保存的以包涵体形式存在的融合蛋白用生理盐水配制成浓度为 4mg/mL 包涵体悬液,与等量弗氏完全佐剂或不完全佐剂混合后,并充分乳化制成油乳苗。在刚开产蛋鸡胸部两侧皮下分别多点注射上述油乳苗 1mL,以间隔两周用同样方法加强免疫两至三次。四免后 5 天开始收集鸡蛋,每间隔 5 天收集一次。采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)方法监测卵黄抗体效价。收集免疫合格的鸡蛋,无菌采集卵黄,并用 9 倍体积的蒸馏水稀释,用 0.1M 的盐酸调节 pH 值 5.0,4℃ 静置过夜,取水层,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌,获得卵黄抗体液。

[0022] 四、融合蛋白免疫制备的卵黄抗体应用效果评价

[0023] 通过卵黄抗体与氟苯尼考联用在体外抑菌效果试验,验证本发明制备的卵黄抗体具有增加氟苯尼考耐药菌株对氟苯尼考敏感性的作用。选择 60 只 15 日龄大小均匀的健康樱桃谷鸭进行鸭疫里默氏杆菌攻毒保护试验,随机分为 3 组,每组 20 只。第一组为氟苯尼考单独给药治疗组,第二组为卵黄抗体联合氟苯尼考治疗组,第三组为生理盐水对照组。结果表明,卵黄抗体联合氟苯尼考治疗组对鸭疫里默氏杆菌氟苯尼考耐药菌株感染的治愈率为 80%,显著高于氟苯尼考单独给药组(治愈率为 25%)。

[0024] 本发明的特点:

[0025] (1) 本发明以 pET-28a(+) 作为表达载体,获得的融合蛋白包含的 HIS 标签分子量较小,减少了标签对目的蛋白片段诱导抗体产生的影响。

[0026] (2) 构建的融合蛋白是以包涵体形式存在,经过简单纯化步骤后,直接以包涵体形式制备免疫原,在免疫原制备上省去了融合蛋白纯化的繁琐步骤,操作更加简便。

[0027] (3) 直接以包涵体形式制备的免疫原具有良好的免疫原性,可以诱导产蛋鸡产生针对 F1oR 蛋白目的片段的特异性抗体。

[0028] (4) 制备的卵黄抗体能够显著提高鸭疫里默氏杆菌氟苯尼考耐药菌株对氟苯尼考的敏感性,由于其他氟苯尼考耐药菌株也主要由 f1oR 基因介导,因此,该卵黄抗体也可用于兽医临床上畜禽氟苯尼考耐药菌株感染的治疗。

[0029] 更详细技术方案参见“具体实施方式”部分。

## 附图说明

[0030] 序列表 SEQ ID NO:1 是本发明克隆的 F1oR 基因片段的核苷酸序列,其中 137 位的碱基由 t 突变为 a。序列长度为 216bp。

[0031] 序列表 SEQ ID NO :2 是本发明克隆的 F1oR 基因片段编码的氨基酸序列,编码 72 个氨基酸。

[0032] 图 1 为本发明的技术路线图。

[0033] 图 2 显示了表达 f1oR 基因部分基因片段的重组质粒 pET-28a(+)-f1oR 构建图。

[0034] 图 3 为本发明中 PCR 扩增出的目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶电泳图谱,显示了该片段大小约为 220bp,与理论值一致,图中 M 为 DNA marker,1 为 PCR 产物。

[0035] 图 4 为本发明中重组大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21/pET-28a(+)-f1oR 全菌体蛋白免疫印迹(Western Blot)图谱,显示了目的蛋白条带,其大小(14kD)与理论值一致,图中 M 为 protein marker,1 为表达产物。

[0036] 图 5 为本发明重组大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21/pET-28a(+)-f1oR 诱导表达的 SDS-PAGE 电泳图谱,显示了目的蛋白条带,其大小(14kD)与理论值一致,图中 M 为 protein marker,1 为重组大肠杆菌诱导表达 6h 后超声破碎的上清液,2-4 分别为重组大肠杆菌诱导表达 4h、5h、6h 后超声破碎提取的包涵体。

## 具体实施方式

[0037] 实施例 1 f1oR 基因部分基因片段的克隆表达

[0038] 1.1 主要材料、试剂及配制

[0039] 大肠杆菌 BL(DE3)、质粒载体 pET-28a(+)、protein marker、兔源 anti-HIS 抗体(即一抗)及羊抗兔 IgG HRP 标记抗体(即二抗)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

[0040] 鸭疫里默氏杆菌(RA-1):由武汉市畜牧兽医科学研究所保存,并于 2008 年 9 月 10 日递交中国·武汉·武汉大学中国典型培养物保藏中心保藏,保藏号为 CCTCC NO:M208128;本发明利用 Kirby-Barer 法(徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学,第三版.北京:人民卫生出版社,2001)测定氟苯尼考对该菌的抑菌圈为 7.5mm,判定为氟苯尼考耐药菌株。

[0041] 树脂型质粒 DNA 小量提取试剂盒购自上海赛百盛基因技术有限公司产品(按该试剂盒的说明书操作)。

[0042] Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Taq Buffer、T4DNA 连接酶均为 Fermentas 公司产品。

[0043] 胰蛋白胨、酵母提取物为 OXOID 公司产品。

[0044] 小牛血清为浙江天杭生物科技有限公司产品。

[0045] DNA marker 为广州东盛生物科技有限公司产品。

[0046] ECL 化学发光试剂为上海闪晶分子生物科技有限公司产品。

[0047] LB 肉汤:胰蛋白胨 10g,酵母提取物 5g,NaCl 10g,用蒸馏水定容至 1000mL,调节 pH 值至 pH7.0,121℃高压蒸汽灭菌 20min,4℃保存备用。

[0048] LB 营养琼脂:胰蛋白胨 10g,酵母提取物 5g,NaCl 10g,用蒸馏水定容至 1000mL,调节 pH 值至 7.0,另加 15g 琼脂粉,121℃高压蒸汽灭菌 15min。倾倒平板,待培养基凝固后倒置于 4℃保存备用。若制备卡那霉素抗性 LB 琼脂,则待培养基温度降至 50℃左右时,加入卡那霉素,使终浓度为 60 μg/mL,后倾倒平板,待培养基凝固后倒置于 4℃保存备用。

[0049] 10% 小牛血清胰蛋白胨大豆琼脂(TSA):称取 TSA(美国 Becton, Dickinson and Company 公司产品)干粉 40g,用蒸馏水定容至 900ml,调节 pH 值至 7.4,121℃高压蒸汽灭菌 20min,待培养基温度降至 50℃左右时,加入回温至 37℃的小牛血清 100mL,混匀后立即

倾倒平板,待培养基凝固后倒置于 4℃保存备用。

[0050]  $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$  溶液:80mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,20mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 。

[0051] SOB 培养基:胰蛋白胨 20g,酵母提取物 5g,NaCl 0.5g,用蒸馏水定容至 1000mL,调节 pH 值至 pH7.0,121℃ 高压蒸汽灭菌 20min,室温保存备用。

[0052] 1.2 引物设计

[0053] 根据 NCBI 数据库中公布的大肠杆菌 f1oR 基因序列(登录号:NC\_012692)设计扩增该基因部分片段的引物,其上游引物(f1oR-U)为:5'-TTTT GGA TCC CTC CTA AAT GCG GGT TTCAGG-3',下游引物(f1oR-D)为:5'-TTTT CTC GAG TGA GAA GGC AAA GCT GAA TCC-3',分别含有 BamH I 和 Xho I 酶切位点(引物序列中的下划线为酶切位点)。引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

[0054] 1.3 质粒提取

[0055] 将氟苯尼考耐药鸭疫里默氏杆菌(CCTCC NO:M208128)接种于 10% 小牛血清 TSA 琼脂。37℃ 培养 24h,收集菌体,用树脂型质粒 DNA 小量提取试剂盒提取耐药质粒(按照该试剂盒提供的使用说明书进行操作)。

[0056] 1.4 目的片段 PCR 扩增

[0057] PCR 反应体系为:Ta q Buffer 10  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (25mM) 10  $\mu\text{L}$ , dNTP (2.0mM) 10  $\mu\text{L}$ , 上游引物(f1oR-U) 2  $\mu\text{L}$ , 下游引物(f1oR-D) 2  $\mu\text{L}$ , 上述提取的质粒 DNA 2  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶(5U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 65  $\mu\text{L}$ 。

[0058] 反应条件:94℃ 预变性 2min;94℃ 变性 1min,50℃ 退火 1min,72℃ 延伸 2min,25 个循环;72℃ 延伸 5min。

[0059] 1.5PCR 产物纯化

[0060] 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳,电泳完毕,紫外光下切下约 220bp 处的特异条带,用上海赛百盛基因技术有限公司的 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物(按照该试剂盒提供的使用说明书进行操作)。

[0061] 1.6 纯化产物酶切及回收

[0062] 将纯化的 PCR 产物用 BamHI 和 XhoI 双酶切,37℃ 酶切 9h 后,用上海赛百盛基因技术有限公司的 PCR 产物纯化试剂盒纯化酶切产物(按照该试剂盒提供的使用说明书进行操作)。

[0063] 1.7 表达载体的构建

[0064] 分别将纯化的酶切产物和用 BamHI 和 XhoI 双酶切、形成粘性末端的表达载体 pET28a(+) 混合,加入 T4DNA 连接酶,22℃ 连接 4h,构建成 pET28a(+)-f1oR 表达载体(或称为重组质粒)(见图 2)。

[0065] 1.8 感受态细胞的制备

[0066] 感受态细胞的制备参考《分子克隆实验指南》第三版(J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔等著,黄培堂等译,北京:科学出版社,2002 年)所述的氯化钙法制备感受态大肠杆菌的方法。

[0067] 挑取 LB 琼脂培养过夜的大肠杆菌 BL21 (DE3)单菌落接种于 LB 液体培养基,37℃ 培养 3 小时。将菌液置冰上 10 分钟,4℃ 4100rpm 离心 10min,收集菌体。用  $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$  溶液重悬菌体,冰浴,4℃ 以 4100rpm 离心 10min,收集菌体,用冰预冷的 0.1mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶

液重悬菌体,得感受态细胞。

[0068] 1.9 表达载体的转化及阳性重组菌株挑选

[0069] 将构建的表达载体 pET28a(+)-f1oR 与感受态细胞混合冰浴 30min,取出 42℃ 水浴 90s,快速转移至冰浴中,使细胞冷却 2min,加入 SOB 培养基,放入摇床中,150rpm 培养 50min,将已转化的感受态细胞涂布于卡那霉素(60  $\mu$ g/mL)抗性的 LB 琼脂,37℃ 培养过夜。

[0070] 挑选单克隆菌落,做好标记,以全菌体 DNA 作为模板,用步骤 1.2 设计的引物(f1oR-U,f1oR-D)进行 PCR 扩增。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行凝胶电泳,紫外光下约 220bp 处有特异性条带(见图 3),说明本发明的重组质粒转化成功,将转化成功的阳性重组大肠杆菌命名为 *Escherichia coli* BL21/pET-28a(+)-f1oR。用上海赛百盛基因技术有限公司的树脂型质粒 DNA 小量提取试剂盒提取重组质粒,送上海生工生物工程股份有限公司进行测序,测序结果表明,扩增片段长度为 216bp,与参考序列仅有一个碱基发生突变(见序列表 SEQ IDNO:1)。

[0071] 1.10 融合蛋白鉴定

[0072] 将转化成功的阳性重组大肠杆菌 BL21/pET-28a(+)-f1oR 接种于 LB 液体培养基,经异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl-D- $\beta$ -thiogalactopyranoside, IPTG)诱导表达后,用 Western Blot 鉴定表达产物:全菌体 SDS-PAGE 电泳后,电转移到 PVDF 膜,然后先后用一抗(兔源 anti-HIS 抗体)和二抗(羊抗兔 IgG HRP 标记抗体)孵育,再在暗室中加入 ECL 化学发光试剂(按照产品提供的使用说明书进行操作),最后用 X-光片显影、定影,有明显的特异表达产物条带存在,其大小与理论值 14kD 相符(见图 4)。

[0073] 实施例 2 免疫原的制备

[0074] 2.1 主要材料、试剂及配制

[0075] 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂为美国 Sigma 公司产品。

[0076] LB 肉汤:胰蛋白胨 10g,酵母提取物 5g,NaCl 10g,用蒸馏水定容至 1000mL,调节 pH 值至 pH7.0,121℃ 高压蒸汽灭菌 20min,4℃ 保存备用。若制备卡那霉素抗性 LB 肉汤,则待培养基温度降至 50℃ 左右时,加入卡那霉素,使终浓度为 60  $\mu$ g/mL,4℃ 保存备用。

[0077] 磷酸盐缓冲液(PBS):称取 NaCl 8g,KCl 0.2g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g,溶于 ddH<sub>2</sub>O800mL 中,调 pH 至 7.4,用双蒸水定容至 1000mL。

[0078] 包涵体洗涤液:称取 NaCl 8g、KCl 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g、Triton-X 10mL,用双蒸水定容至 1000mL。

[0079] 包涵体溶解和重折叠缓冲液:

[0080] 缓冲液 A:8mol/L 尿素;0.5mol/L NaCl;20mmol/L Tris-Cl;1mmol/L EDTA;pH 8.0。

[0081] 缓冲液 B:6mol/L 尿素;0.5mol/L NaCl;20mmol/L Tris-Cl;1mmol/L EDTA;pH 8.0。

[0082] 缓冲液 C:4mol/L 尿素;0.5mol/L NaCl;20mmol/L Tris-Cl;1mmol/L EDTA;pH 8.0。

[0083] 缓冲液 D:2mol/L 尿素;0.5mol/L NaCl;20mmol/L Tris-Cl;1mmol/L EDTA;pH 8.0。

[0084] 缓冲液 E:0.5mol/L NaCl;20mmol/L Tris-Cl;1mmol/L EDTA;pH 8.0。



[0085] 2.2 重组菌株最佳诱导表达条件的确定

[0086] 挑取重组大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21/pET-28a(+)-floR 单菌落接种于卡那霉素 (60  $\mu$ g/mL) 抗性 LB 肉汤, 37 $^{\circ}$ C, 250rpm 摇床振荡培养过夜, 将培养过夜的菌液按体积比 1:100 比例加入到新鲜的卡那霉素 (60  $\mu$ g/mL) 抗性 LB 肉汤中, 37 $^{\circ}$ C, 250rpm 摇床振荡培养 3.5h, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0mM, 37 $^{\circ}$ C 培养诱导表达, 诱导表达时间分别为 4h、5h、6h, 离心收集菌体, 经超声波破碎 (破碎功率 420w, 破碎总时间 15min、工作 15s、停 15s) 后, 分别收集上清液和包涵体, 用 SDS-PAGE 电泳鉴定。结果表明最佳诱导时间为 6h, 融合蛋白主要以包涵体的形式存在 (见图 5)。

[0087] 2.3 包涵体的提取

[0088] 重组菌 *Escherichia coli* BL21/pET-28a(+)-floR 用最佳诱导表达条件大容量培养后, 离心收集菌体, 按每 g 湿菌加入 10mL PBS 悬浮。冰浴超声破碎 (破碎功率 420w, 破碎总时间 15min、工作 15s、停 15s), 显微镜检查细菌破碎完全。超声破碎完全的菌体于 12000rpm 离心 10min, 收集包涵体。每 g 湿菌获得的包涵体加入包涵体洗涤液 5mL, 充分振摇后, 12000rpm 离心 10min, 收集包涵体; 该包涵体重复洗涤一次, 获得的包涵体冷冻干燥, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0089] 2.4 包涵体溶解和重折叠

[0090] 参考《分子克隆实验指南》第三版 (J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔等著, 黄培堂等译, 北京: 科学出版社, 2002 年) 包涵体溶解和重折叠的方法, 将实施例 2.3 中制备的包涵体用缓冲液 A 溶解, 起始浓度为 1mg/mL, 将溶解的包涵体溶液置于透析袋中, 4 $^{\circ}$ C 条件下, 依次在缓冲液 B、C、D、E 中透析一次, 每次透析时间为 6-10h; 然后置于 PBS 中透析 4 次, 每次透析时间为 6-10h。透析完毕后, 12000rpm 离心 10min, 取上清, 采用 Folin-酚法测定蛋白质浓度为 0.2mg/mL。用微孔滤膜过滤除菌后分装置 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

[0091] 2.5 免疫原的制备

[0092] 取实施例 2.3 制备的冻干保存的包涵体, 用生理盐水配制 4mg/mL 包涵体混悬液, 与等量的弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂充分混匀匀浆后得免疫原。

[0093] 实施例 3 抗体的制备及生物活性测定

[0094] 3.1 主要材料、试剂及配制

[0095] 鸭疫里默氏杆菌: 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC NO: M208128。

[0096] 大肠杆菌 (ATCC25922) 由华中农业大学兽医药理学实验室惠赠 (购于北京, 中国兽药监察所)。

[0097] 氟苯尼考药物由湖北中牧安达药业有限公司惠赠。

[0098] 鼠抗鸡 IgG 酶标二抗为武汉三鹰生物技术有限公司产品。

[0099] 磷酸盐缓冲液 (PBS): 称取 NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g, 溶于 ddH<sub>2</sub>O 800mL 中, 调 pH 至 7.4, 定容至 1000mL。

[0100] 包被液: NaHCO<sub>3</sub> 2.93g; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.95g; 溶于 900mL 蒸馏水中, 10mol/L NaOH 调 pH 至 9.6, 用蒸馏水定容至 1000mL。

[0101] 封闭液: 含 1% 牛血清白蛋白的 PBS。

[0102] 洗涤液: 含 0.05% 吐温 -20 的 PBS。

[0103] 底物液 A :3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯二胺 200mg, 无水乙醇 100mL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000mL。

[0104] 底物液 B :Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.6g, 柠檬酸 9.3g, 0.75% 过氧化氢脲 6.4mL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000mL。

[0105] 底物混合液 :将底物液 A 和底物液 B 按体积比 1:1 混合即得, 现配现用。

[0106] 终止液 (2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液) :浓硫酸 22.2mL, 蒸馏水 177.8mL, 混匀即可。

[0107] 10% 小牛血清胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) :称取 TSB (美国 Becton, Dickinson and Company 公司产品) 干粉 20g, 用蒸馏水定容至 900ml, 调节 pH 值至 7.4, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min, 待培养基温度降至 50℃ 左右时, 加入回温至 37℃ 的小牛血清 100mL, 混匀后置于 4℃ 保存备用。

[0108] 3.2 产蛋鸡免疫及鸡蛋收集

[0109] 选取刚开产“海兰褐”蛋鸡 (为常规蛋鸡品种) 10 只, 用上述制备的免疫原每只胸部多点皮下注射 1mL, 首免用弗氏完全佐剂制备的免疫原, 加强免疫用弗氏不完全佐剂制备的免疫原。每次免疫间隔时间为 2 周。于第 4 次免疫后第 5 天开始收集鸡蛋, 每间隔 5 天收集一次, 共收集 7 批次。每批随机抽取 3 枚鸡蛋, 取卵黄, 采用常规的 ELISA 方法 (朱立平、陈学清. 免疫学常用试验方法. 北京 :人民军医出版社, 2000) 测定其抗体效价。

[0110] 3.3 卵黄抗体提取

[0111] 根据抗体效价测定的结果, 收集免疫合格鸡蛋, 用于卵黄抗体的制备。鸡蛋用 70% 酒精浸泡消毒后, 无菌取卵黄, 将卵黄用 9 倍体积的蒸馏水稀释, 用 0.1M 的盐酸调节 pH 值至 5.0, 4℃ 静置过夜, 取水层, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌, 即得卵黄抗体液。

[0112] 3.4 卵黄抗体 ELISA 效价测定

[0113] 按照文献方法 (朱立平、陈学清. 免疫学常用试验方法. 北京 :人民军医出版社, 2000), 采用 ELISA 方法检测卵黄抗体效价。包被原为实施例 2.4 制备的包涵体溶解重折叠的融合蛋白 (浓度为 0.2mg/mL), 用包被液稀释成 8 μg/mL 包被酶标板, 4℃ 过夜, 用洗涤液洗涤 3 次, 拍干 ;用封闭液 37℃ 封闭 1h, 洗涤液洗涤 3 次, 拍干。卵黄抗体溶液用 PBS 按体积比 1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400、1:204800 作倍比稀释, 同时设置阴性对照组 (未用免疫原免疫鸡所产的蛋制备的卵黄抗体), 用 PBS 按体积比 1:2000 稀释。将稀释好的卵黄抗体加入到已包被的酶标板中, 每孔 100 μL, 于 37℃ 孵育 1h, 洗涤 3 次, 每孔加入 1:5000 倍稀释鼠抗鸡 IgG 酶标二抗 100 μL, 于 37℃ 孵育 1h, 洗涤 3 次, 最后每孔加入底物混合液 100 μL, 37℃ 避光孵育 15min, 加入终止液终止反应。用酶标仪测定 OD 值, 以卵黄抗体溶液 OD 值大于 3 倍阴性对照 OD 值的最大稀释度为卵黄抗体效价。结果见表 1, 结果表明 :经过 4 次免疫后, 本发明制备的卵黄抗体效价介于 1:51200 和 204800 之间, 抗体效价维持在 1:51200 之上的时间为 35d 及以上。

[0114] 表 1 第 4 次免疫后本发明制备的卵黄抗体的效价

[0115]

	免疫后 5d	免疫后 10d	免疫后 15d	免疫后 20d	免疫后 25d	免疫后 30d	免疫后 35d
蛋 1	102400	102400	204800	102400	102400	204800	102400
蛋 2	204800	102400	102400	102400	102400	51200	51200
蛋 3	102400	204800	102400	51200	204800	51200	51200

[0116] 3.5 本发明制备的卵黄抗体与氟苯尼考联用在体外抑菌效果试验

[0117] 参考徐叔云等的《药理实验方法学》第三版(徐叔云,卞如濂,陈修.北京:人民卫生出版社,2001),采用二倍管稀释法测定氟苯尼考联合卵黄抗体对鸭疫里默氏杆菌(CCTCC NO:M208128)的最低抑菌浓度(MIC)。具体方法及结果为:

[0118] (1) 氟苯尼考原液配制:

[0119] 用二甲亚砜配制浓度为  $5120 \mu\text{g} / \text{mL}$  的氟苯尼考原液备用。

[0120] (2) 菌液配制:

[0121] 将鸭疫里默氏杆菌和质控菌株大肠杆菌 ATCC25922 分别接种于 10% 小牛血清 TSB 肉汤,  $37^{\circ}\text{C}$  培养过夜,用 10% 小牛血清 TSB 肉汤稀释成浓度为  $10^7\text{CFU}/\text{mL}$  备用。

[0122] (3) 含卵黄抗体的 TSB 肉汤配制:

[0123] 取本实施例 3.3 步骤制备的卵黄抗体(ELISA 测定效价为 1:102400)1 份,取 10% 小牛血清 TSB 肉汤 99 份,无菌条件下充分混匀后备用(卵黄抗体的最终稀释度为 1:1000)。

[0124] (4) 试验组设置:

[0125] 取  $13\text{mm} \times 100\text{mm}$  试管 36 支,排成 3 排,每排 12 支,第一排为卵黄抗体试验组,第二排为卵黄抗体阴性对照组,第三排为质控菌株(ATCC25922)对照组。另取 3 支同样试管,分别标记上“TSB 肉汤对照”,“检测菌生长对照”和“质控菌生长对照”。第一排除第一支试管外,每支试管加入含卵黄抗体的 TSB 肉汤 2mL;然后用含卵黄抗体的 TSB 肉汤稀释氟苯尼考原液至浓度为  $512 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,分别在第一和第二支试管中加 2mL;第二管混匀后吸出 2mL 加入到第三管中,依次对倍稀释到第 12 管,从第 12 管中吸出 2mL 弃去。第二排和第三排操作方法同第一排,只是将含卵黄抗体的 TSB 肉汤换成 10% 小牛血清 TSB 肉汤。这样每管抗菌药物的最终浓度依次为 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0126] (5) 接种:

[0127] 用微量加样器取 0.1mL 鸭疫里默氏杆菌菌液( $10^7\text{CFU}/\text{mL}$ )依次由低浓度到高浓度加到第一排和第二排每支试管中;用微量加样器取 0.1mL 大肠杆菌(ATCC25922)菌液( $10^7\text{CFU}/\text{mL}$ )依次由低浓度到高浓度加到第三排每支试管中。最终接种菌量约  $5 \times 10^7\text{CFU}/\text{mL}$ 。加样时加样器的吸头必须插到管内液面下加菌,并注意避免与管内壁接触,加好菌液后的试管应避免晃动。“TSB 肉汤对照”仅加入 2mL 卵黄抗体的 TSB 肉汤,不接种任何细菌;“检测菌生长对照”和“质控菌生长对照”分别用鸭疫里默氏杆菌和大肠杆菌 ATCC25922 接种于 10%TSB 肉汤。置于  $35^{\circ}\text{C}$  培养 24h 后判定 MIC(氟苯尼考药物敏感性判定标准:  $\text{MIC} \leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$  为敏感、 $\text{MIC}=8 \mu\text{g}/\text{mL}$  为中介、 $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$  为耐药)。

[0128] (6) 结果:

[0129] “TSB 肉汤对照”无细菌生长;“检测菌生长对照”和“质控菌生长对照”细菌生长良好;质控大肠杆菌(ATCC25922)MIC 为  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,符合质控菌株  $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。对照组和质

控菌株条件均成立,卵黄抗体试验组和卵黄抗体阴性对照组 MIC 测定结果有效。

[0130] 卵黄抗体阴性对照组 MIC 为  $32 \mu\text{g/mL}$ ,卵黄抗体试验组 MIC 为  $2 \mu\text{g/mL}$ ,结果表明,本发明制备的卵黄抗体可显著提高鸭疫里默氏杆菌耐药菌株对氟苯尼考的敏感性。

[0131] 实施例 4 本发明制备的卵黄抗体联合氟苯尼考治疗鸭疫里默氏杆菌耐药菌株感染效果试验

[0132] 4.1 鸭疫里默氏杆菌最低致死剂量测定

[0133] 参考徐叔云等的《药理实验方法学》第三版(徐叔云,卞如濂,陈修.北京:人民卫生出版社,2001)中的方法,测定鸭疫里默氏杆菌(CCTCC NO:M208128)的最低致死量。

[0134] (1) 预试验:

[0135] 选择 15 日龄健康樱桃谷肉鸭 40 只,平均分为 4 组。将用 TSA 琼脂培养过夜的鸭疫里默氏杆菌用生理盐水分别稀释成  $10^8\text{CFU/mL}$ 、 $10^7\text{CFU/mL}$ 、 $10^6\text{CFU/mL}$ ,每个菌液浓度为一个处理组,每组每只鸭腿部肌肉注射鸭疫里默氏杆菌菌液 0.5mL;同时设置一个空白对照组,每只鸭腿部肌肉注射生理盐水 0.5mL。攻毒后观察 5d。结果表明,鸭死亡主要集中在攻毒后第 2-3 天,各组死亡率分别为:空白对照组为 0,  $10^8\text{CFU/mL}$  剂量组为 100%,  $10^7\text{CFU/mL}$  剂量组为 70%,  $10^6\text{CFU/mL}$  剂量组为 0,因此,最低致死剂量介于  $10^8\text{CFU/mL}$  和  $10^7\text{CFU/mL}$  之间。

[0136] (2) 正式测定:

[0137] 选择 15 日龄健康樱桃谷肉鸭 40 只,平均分为 4 组。将用 TSA 琼脂培养过夜的鸭疫里默氏杆菌用生理盐水分别稀释成  $10^8\text{CFU/mL}$ 、 $5 \times 10^7\text{CFU/mL}$ 、 $2.5 \times 10^7\text{CFU/mL}$ ,每个菌液浓度为一个处理组,每组每只鸭腿部肌肉注射菌液 0.5mL;同时设置一个空白对照组,每只鸭腿部肌肉注射生理盐水 0.5mL。攻毒后观察 5d。结果表明,鸭死亡主要集中在攻毒后第 2-3 天,各组死亡率分别为:空白对照组为 0、 $10^8\text{CFU/mL}$  剂量组为 100%、 $5 \times 10^7\text{CFU/mL}$  剂量组为 100%、 $2.5 \times 10^7\text{CFU/mL}$  剂量组为 90%。因此确定鸭疫里默氏杆菌最低致死剂量为  $5 \times 10^7\text{CFU/mL}$ 。

[0138] 4.2 本发明制备的卵黄抗体联合氟苯尼考治疗效果测定

[0139] 选择 15 日龄健康樱桃谷肉鸭 60 只,按最低致死剂量( $5 \times 10^7\text{CFU/mL}$ )攻毒,每只腿部肌肉注射 0.5mL。然后平均分成 3 组,第一组为氟苯尼考单独给药治疗组,给药剂量为  $30\text{mg/kg}$  体重,腿部肌肉注射,每天注射一次,连续 3d;第二组为本发明制备的卵黄抗体联合氟苯尼考治疗组,其中:氟苯尼考给药剂量为  $30\text{mg/kg}$  体重,腿部肌肉注射,本发明制备的卵黄抗体(实施例 3.3 制备)给药剂量为  $2\text{mL/kg}$  体重,对侧腿部肌肉注射,每天给药一次,连续 3d。第三组为生理盐水对照组,按每 kg 体重腿部肌肉注射生理盐水 2mL,每天一次,连续 3d。攻毒后观察 5d。结果表明,鸭死亡主要集中在攻毒后第 2-3 天,5 天后未死亡鸭均恢复采食和饮水,精神状态恢复正常。统计不同处理组死亡率和治愈率(以鸭恢复采食和饮水、精神状态恢复正常为治愈),结果见表 2。

[0140] 表 2 不同处理组鸭死亡率和治愈率

组别	动物数（羽）	攻毒后死亡数（羽）					死亡率 （%）	治愈率 （%）	
		1d	2d	3d	4d	5d			
[0141]	1	20	0	6	8	1	0	75	25
	2	20	0	2	2	0	0	20	80
	3	20	2	7	9	2	0	100	0

[0001]

## 说明书序列表

&lt;110&gt; 武汉市畜牧兽医科学研究所

&lt;120&gt; 包含氟苯尼考耐药基因蛋白的卵黄抗体及制备与应用

&lt;130&gt;

&lt;141&gt; 2012-12-02

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 216

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 鸭疫里默氏杆菌

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gene

&lt;222&gt; (1).. (216)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (216)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mutation

&lt;222&gt; (137).. (137)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

ctc cta aat gcg ggt ttc agg tgg cac gaa acc cgc cct ctg gat caa	48
Leu Leu Asn Ala Gly Phe Arg Trp His Glu Thr Arg Pro Leu Asp Gln	
1 5 10 15	

gtc aag acg cgc cga tct gtc ttg ccg atc ttc gcg agt ccg gct ttt	96
Val Lys Thr Arg Arg Ser Val Leu Pro Ile Phe Ala Ser Pro Ala Phe	
20 25 30	

tgg gtt tac act gtc ggc ttt agc gcc ggt atg gcc acc tac ttc gtc	144
---	-----

[0002]

Trp Val Tyr Thr Val Gly Phe Ser Ala Gly Met Gly Thr Tyr Phe Val  
 35 40 45

ttc ttc tcg acg get ccc cgt gtg etc ata ggc caa gcg gaa tat tcc 192  
 Phe Phe Ser Thr Ala Pro Arg Val Leu Ile Gly Gln Ala Glu Tyr Ser  
 50 55 60

gag atc gga ttc agc ttt gcc ttc 216  
 Glu Ile Gly Phe Ser Phe Ala Phe  
 65 70

<210> 2

<211> 72

<212> PRT

<213> 鸭疫里默氏杆菌

<400> 2

Leu Leu Asn Ala Gly Phe Arg Trp His Glu Thr Arg Pro Leu Asp Gln  
 1 5 10 15

Val Lys Thr Arg Arg Ser Val Leu Pro Ile Phe Ala Ser Pro Ala Phe  
 20 25 30

Trp Val Tyr Thr Val Gly Phe Ser Ala Gly Met Gly Thr Tyr Phe Val  
 35 40 45

Phe Phe Ser Thr Ala Pro Arg Val Leu Ile Gly Gln Ala Glu Tyr Ser  
 50 55 60

Glu Ile Gly Phe Ser Phe Ala Phe  
 65 70



图 1



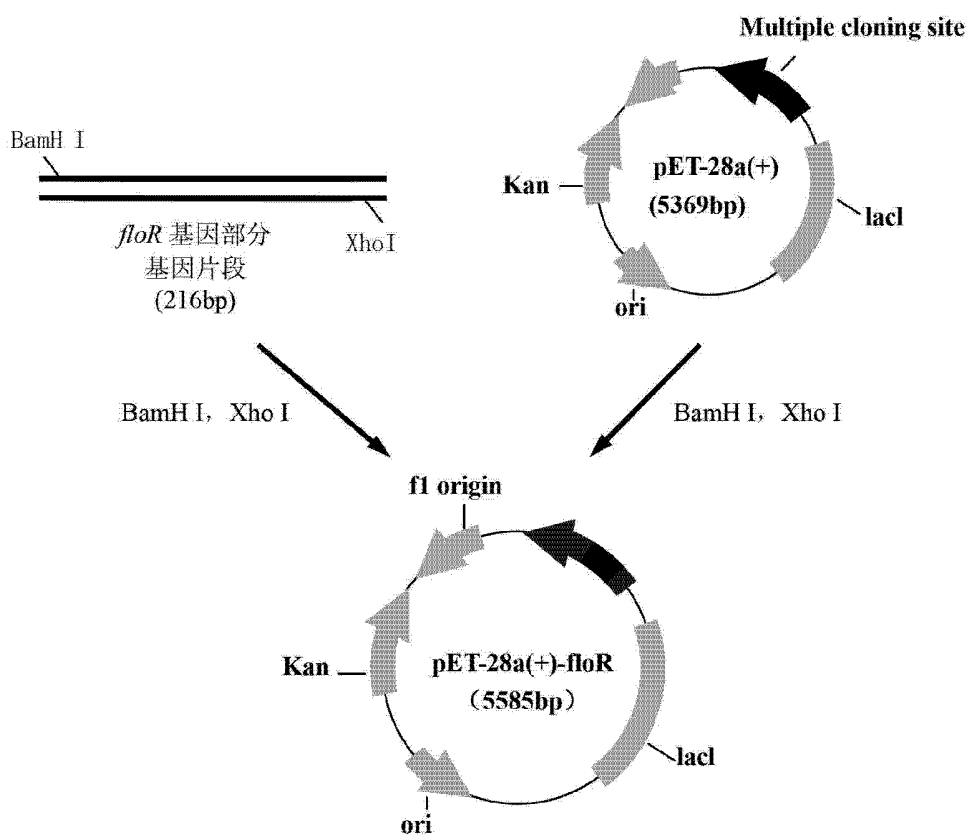


图 2

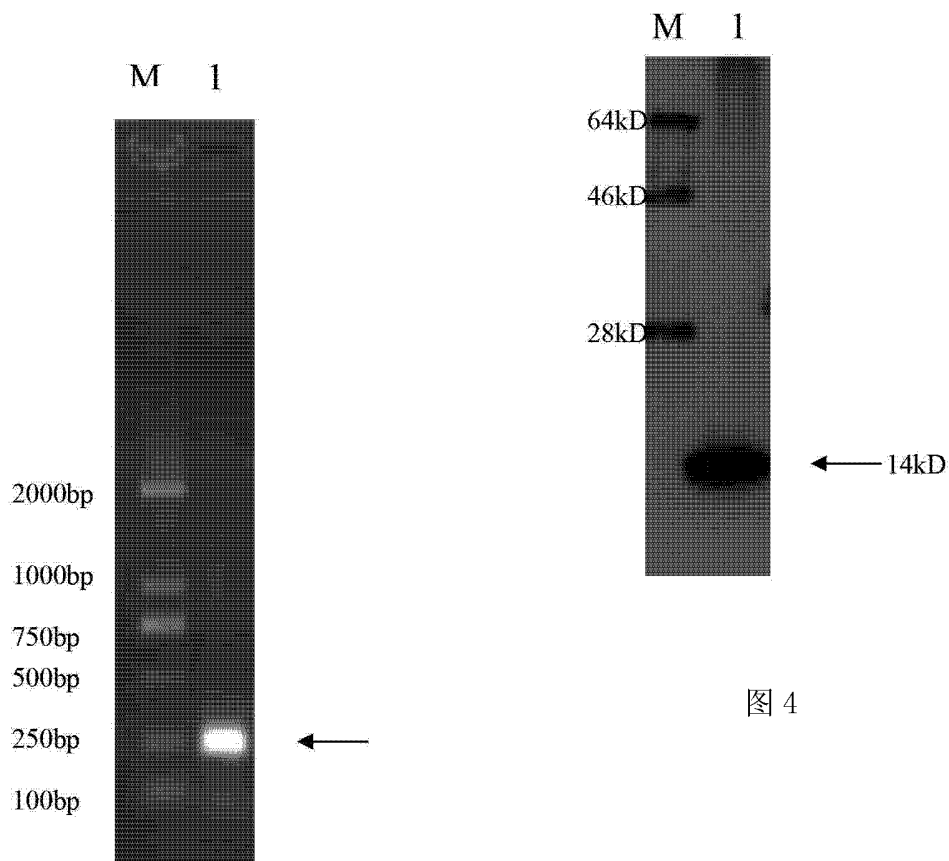


图 4

图 3

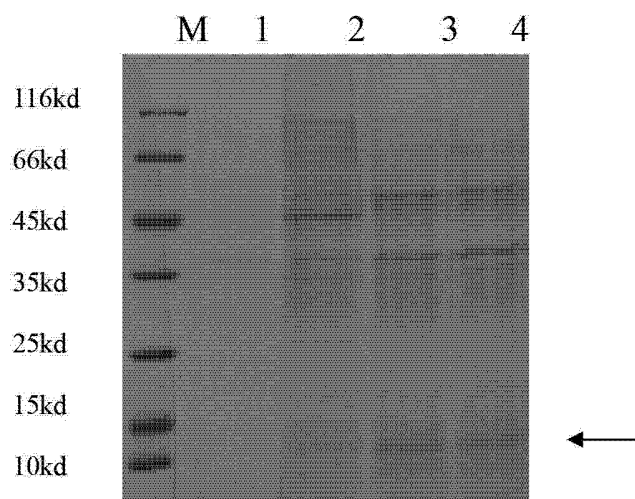


图 5