(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104093419 B
(45)授权公告日 2016.04.20

(21)申请号 201280061063.7
(22)申请日 2012.12.10
(66)本国优先权数据
201210357304.4 2012.09.24 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.06.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2012/001677 2012.12.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/043838 ZH 2014.03.27
(73)专利权人 河北科星药业有限公司
地址 050200 河北省石家庄市鹿泉市高新技术产业开发区昌盛大街114号
(72)发明人 张鑫 马兴树 牛志勇 陈淑芳 刘志辉
(74)专利代理机构 石家庄科诚专利事务所 13113
代理人 张红卫
(51)Int.Cl.
A61K 39/108(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)

(56)对比文件
魏宽翠等．禽致病性大肠埃希菌黏附素研究进展．《动物医学进展》.2012, 第33卷(第3期),105-109.
伊亚莉．紫花苜蓿几丁质酶Class Ⅰ基因的克隆、序列分析及其表达．《中国优秀硕士学位论文全文数据库农业科技辑》.2011,(第10期),D047-102.

审查员 曹丙洲

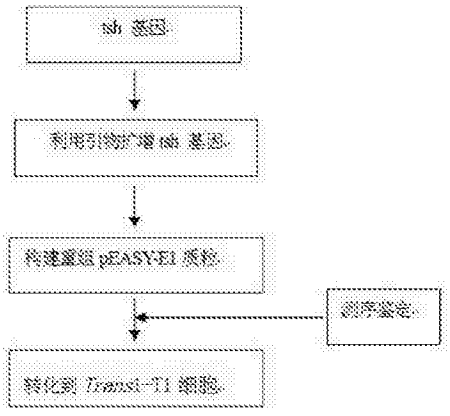
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法，包括将具有粘附作用的tsh基因重组于大肠杆菌BL21(DE3)，所制得的菌苗可抢先与禽体细胞上的相应受体结合，致使禽致病性大肠杆菌无受体可结合，从而来减少禽类的发病。



CN 104093419 B

1.一种预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法，其特征在于它按照以下步骤顺序进行：

(1)重组质粒的构建

①以禽致病性大肠杆菌基因组为模板，利用PCR技术对温度敏感血凝素tsh基因进行扩增；

②将扩增后的温度敏感血凝素tsh基因插入到表达载体pEASY-E1上，构建重组质粒载体，再转化到Trans1-T1克隆感受态细胞中；

③对Trans1-T1克隆感受态细胞进行培养，并提取质粒；

(2)基因的表达

将质粒转化到感受态细胞BL21(DE3)中，对感受态细胞BL21(DE3)进行培养；

(3)菌苗的制备

将培养后的感受态细胞BL21(DE3)用双蒸水稀释到OD值为0.800后，最终制得预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗；

其中，步骤①中PCR扩增温度敏感血凝素tsh基因，使用的引物如下

上游引物为zx1:5'-atgaacagaatttattctcttcgc-3'，

下游引物为zx2:5'-gaatgaataacgaatattagcgttt-3'。

2.根据权利要求1所述的预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法，其特征在于步骤①中PCR扩增温度敏感血凝素tsh基因具体过程如下：

活化培养APEC菌株，并提取质粒，以提取的质粒作为PCR反应的模板；

将扩增温度敏感血凝素tsh基因，96℃预变性5min，94℃变性1min；

50℃退火30～60s，72℃延伸1～2min，30个循环；

72℃延伸10min后，置于4℃冰箱保存，即得扩增后的温度敏感血凝素tsh基因。

3.根据权利要求1所述的预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法，其特征在于步骤②的具体操作按照以下步骤顺序进行：

A1、将PCR扩增后的温度敏感血凝素tsh基因、pEASY-E1载体和双蒸水混匀后置于25℃，保温20min，形成PCR产物和pEASY-E1载体构建的重组质粒；

B1、加重组质粒于50μL Trans1-T1感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴10～15min；

C1、42℃热激30s后，立即置于冰上；

D1、然后，将感受态细胞加入到温度为室温的LB液体培养基中，放进摇床，37℃下200rpm孵育1h，得菌液；

E1、取200μL菌液置于平板上进行铺板，培养过夜，即得含有重组质粒的Trans1-T1细胞。

4.根据权利要求3所述的预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法，其特征在于：步骤E1中所述的平板为用LB固体培养基置于培养皿中所制的平板，其中LB培养基中含有40mg/mL氨苄青霉素钠；

所述的LB固体培养基配方包括：

Yeast extract 5g,Tryptone 10g,NaCl 5g,琼脂 10g,其余为双蒸水，定容至1L。

5.根据权利要求3所述的预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法，其特征在于步骤D1中所述的LB液体培养基配方包括：

Yeast extract 5g,Tryptone 10g,NaCl 5g,其余为双蒸水,定容至1L。

6.根据权利要求1所述的预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法,其特征在于步骤③的具体操作按照以下步骤顺序进行:

A2、挑取单克隆菌落于1.5mL LB培养基中,37℃下300rpm培养 18h;

B2、取培养的菌液进行离心操作,离心力为10000g,离心时间为1min,弃去上清液,留下菌体沉淀;

C2、向菌体沉淀中加入250μL的Solution Ⅰ,漩涡2min,得到溶液a;

D2、向溶液a中加入250μL的Solution Ⅱ,旋转离心管轻轻混匀,孵育3min,得到溶液b;

E2、向溶液b中加入350μL Solution Ⅲ,混合立即颠倒几次,直到出现絮状物沉淀,得到溶液c;

F2、将溶液c在13000g下离心10min,得到上清液和白色沉淀物;

G2、向2mL带有离心柱的离心管中,加入100μL平衡液,13000g离心60s,弃去流出液;

H2、小心吸取F2步得到的上清液于离心柱中,13000g离心1min,弃去流出液;

I2、加入500μL HB Buffer,13000g离心60s,弃去流出液;

J2、加入700μL DNA wash buffer,13000 g离心60s,弃去流出液;

K2、重复步骤J2,弃去流出液;

L2、13000g离心2min,彻底去除液体,得到含有质粒DNA的离心柱;

M2、将含有质粒DNA的离心柱加入到干净的1.5mL的离心管中,加入50μL EB,室温孵育60s,13000g离心60s,收集DNA,得到重组质粒。

7.根据权利要求6所述的预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法,其特征在于:所述的步骤C2中所述的Solution Ⅰ、步骤D2中所述的Solution Ⅱ、步骤E2中所述的Solution Ⅲ、步骤G2中所述的平衡液、步骤I2中所述的HB Buffer和步骤J2中所述的 DNA wash buffer均为Plasmid Mini Kit I D6943-01*型号的OMEGA公司生产的试剂盒中的组成。

8.根据权利要求1所述的预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法,其特征在于步骤(2)的具体操作如下:

A3、取50μL冰浴上融化的BL21(DE3)感受态细胞,加入重组质粒中,轻轻摇匀,在冰浴中放置30min,得到细胞膜上结合有重组质粒的BL21(DE3)细胞;

B3、将细胞膜上结合有重组质粒的BL21(DE3)细胞在42℃水浴条件下热激45s,然后快速平稳的转移到冰浴中2min,得到细胞中含有重组质粒的BL21(DE3)细胞;

C3、向细胞中含有重组质粒的BL21(DE3)细胞中加入500μL 无菌的不含抗生素的LB培养基,混匀后置于37℃,200rpm培养2h,得到复苏的菌体;

D3、吸取不同体积复苏的菌体涂布到固体LB培养基上,37℃培养16h;

E3、挑取在培养基上生长的菌落,进行PCR鉴定。

9.根据权利要求1所述的预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法,其特征在于步骤(3)的具体操作如下:

将发酵培养的菌液用双蒸水稀释到OD值为0.800,以此来做为免疫菌苗注射液。

预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于兽用菌苗领域，具体地说是一种预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法。

背景技术

[0002] 大肠杆菌病是指部分或全部由禽致病性大肠杆菌(APEC)所引起的局部或全身性感染的疾病，包括大肠杆菌性败血症，大肠杆菌性肉芽肿(Hjarre病)、气囊病(慢性呼吸道疾病即CRD)、大肠杆菌性蜂窝织炎(即炎性过程)、肿头综合症、大肠杆菌性腹膜炎、大肠杆菌性输卵管炎、大肠杆菌性骨髓炎/滑膜炎(即火鸡骨髓炎综合征)、大肠杆菌性全眼球炎及大肠杆菌性脐炎/卵黄囊感染。大肠杆菌在哺乳动物主要引起肠道疾病，而在禽类，当禽类收到高致病性大肠杆菌感染而使其防御能力不足以抵抗或完全丧失时，常会引起典型的继发性局部或全身性感染。大肠杆菌病给养禽业造成了严重的损失，是禽病调查中最常报道的疾病及酮体废弃的主要原因。有资料显示：禽肉加工中43％肉鸡酮体的报废与大肠杆菌性败血症有关。

[0003] 现有技术主要是通过利用抗菌素来进行致病性大肠杆菌的治疗，但是随着细菌耐药性的增强，鸡大肠杆菌病也越来越难以防治，同时抗生素的用量越来越大，导致养殖业给环境带来的影响也越来越严重。另外传统疫苗都是通过改变培养条件，或在不同寄主动物上传代的办法使致病微生物的毒性减弱；或是通过物理化学的方法将它们灭活。但这样的疫苗都不理想。因为弱化的菌株可能发生回复突变而变成有毒的，或者失去免疫原性，灭活不适当的疫苗还会引起疾病的流行；而且许多疫苗需要冷冻，造成运输上困难，不适合于实际使用。对于亚基疫苗，虽说是其去除病原体中与激发保护性免疫无关甚或有害的成分，但是依旧保留毒性蛋白的有效免疫原成分。因此，迫切需要发展一种性能更加的新型预防大肠杆菌病的广谱菌苗。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题，是提供一种预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法，所制得的预防禽类大肠杆菌的广谱菌苗是非大肠杆菌毒基因所表达的蛋白，是竞争性优先抢占禽体细胞表面的粘附受体，从而终止了致病性大肠杆菌进入禽体细胞的正常途径，从而免疫禽类。本产品可以直接应用于禽大肠杆菌病的临床免疫，防止禽感染致病性大肠杆菌而致病，进而提高养殖经济效益。

[0005] 为解决上述技术问题，本发明所采取的技术方案是：

[0006] 一种预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法，它按照以下步骤顺序进行：

[0007] (1)重组质粒的构建

[0008] ①以禽致病性大肠杆菌基因组为模板，利用PCR技术对温度敏感血凝素tsh基因进行扩增；

[0009] ②将扩增后的温度敏感血凝素tsh基因插入到表达载体pEASY-E1上，构建重组质

粒载体，再转化到Trans1-T1克隆感受态细胞中；

[0010] ③对Trans1-T1克隆感受态细胞进行培养，并提取质粒；

[0011] (2)基因的表达

[0012] 将质粒转化到感受态细胞BL21(DE3)中，对感受态细胞BL21(DE3)进行培养；

[0013] (3)菌苗的制备

[0014] 将培养后的感受态细胞BL21(DE3)用双蒸水稀释到OD值为0.800后，最终制得预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗。

[0015] 作为本发明的一种限定，步骤①中PCR扩增温度敏感血凝素tsh基因，使用的引物如下：

[0016] 上游引物为zx1:5'-atgaacagaatttattctcttcgc-3'

[0017] 下游引物为zx2:5'-gaatgaataacgaatattagcgttt-3'。

[0018] 作为本发明的另一种限定，步骤①中PCR扩增温度敏感血凝素tsh基因的反应体系如下：

[0019] 96℃预变性5min；

[0020] 94℃变性1min，50℃退火30～60s，72℃延伸1～2min，30个循环；

[0021] 72℃延伸10min；

[0022] 置于4℃冰箱保存，即得扩增后的温度敏感血凝素tsh基因。

[0023] 作为本发明的第三种限定，步骤②具体操作如下：

[0024] A1、将PCR扩增后的温度敏感血凝素tsh基因、pEASY-E1载体和双蒸水混匀后置于25℃，保温20min，形成PCR产物和pEASY-E1载体构建的重组质粒；

[0025] B1、加上述重组质粒于50μL Trans1-T1感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴10～15min；

[0026] C1、42℃热激30s后，立即置于冰上；

[0027] D1、后加入到温度为室温的LB液体培养基中，放进摇床，37℃下200rpm孵育1h，得菌液；

[0028] E1、取200μL菌液置于平板上进行铺板，培养过夜，即得含有重组质粒的Trans1-T1细胞。

[0029] 作为进一步限定：

[0030] 步骤D1中所述的LB液体培养基配方包括：

[0031] Yeast extract 5g，Tryptone 10g，NaCl 5g，其余为双蒸水，定容至1L；

[0032] 步骤E1中所述的平板为用LB固体培养基置于培养皿中所制的平板，其中LB培养基上含有40mg/mL氨苄青霉素钠。所述的LB固体培养基配方包括：Yeast extract 5g，Tryptone 10g，NaCl 5g，琼脂10g，其余为双蒸水，定容至1L。

[0033] 作为本发明的第三种限定，步骤③具体操作如下：

[0034] A2、挑取单克隆菌落于1.5mL LB培养基中，37℃下300rpm培养18h；

[0035] B2、取培养的菌液进行离心，离心力为10000g，离心时间为1min，弃去上清液，留下菌体沉淀；

[0036] C2、向菌体沉淀中加入250μL的Solution I，漩涡2min，得到溶液a；

[0037] D2、向溶液a中加入250μL的Solution II，旋转离心管轻轻混匀，孵育3min，得到溶液b；

[0038] E2、向溶液b中加入350μL Solution III，混合立即颠倒几次，直到出现絮状物沉淀，得到溶液c；

[0039] F2、将溶液c在13000g下离心10min，得到上清液和白色沉淀物；

[0040] G2、向2mL带有离心柱的离心管中，加入100μL平衡液，13000g离心60s，弃去流出液；

[0041] H2、小心吸取F2步得到的上清液于离心管中，13000g离心1min，弃去流出液；

[0042] 12、加入500μL HB Buffer，13000g离心60s，弃去流出液；

[0043] J2、加入700μL DNA wash buffer，13000g离心60s，弃去流出液；

[0044] K2、重复步骤J2，弃去流出液；

[0045] L2、13000g离心2min，彻底去除液体，得到含有质粒DNA的离心柱；

[0046] M2、将含有质粒DNA的离心柱加入到干净的1.5mL的离心管中，加入50μL EB，室温孵育60s，13000g离心60s，收集DNA，得到重组质粒。

[0047] 作为上述限定的进一步限定，所述的步骤C2中所述的Solution I、步骤D2中所述的Solution II、步骤E2中所述的Solution III、步骤G2中所述的平衡液、步骤I2中所述的HB Buffer和步骤J2中所述的DNA wash buffer均为PlasmidMini Kit I D6943-01*型号的OMEGA公司生产的的试剂盒中的组成。

[0048] 作为本发明的第五种限定，步骤(2)的具体操作如下：

[0049] A3、取50μL冰浴上融化的-70℃的BL21(DE3)感受态细胞，加入重组质粒中，轻轻摇匀，在冰浴中放置30min，得到细胞膜上结合有重组质粒的BL21(DE3)细胞；

[0050] B3、将细胞膜上结合有重组质粒的BL21(DE3)细胞42℃水浴条件下热激45s，然后快速平稳的转移到冰浴中2min，得到细胞中合有重组质粒的BL21(DE3)细胞；

[0051] C3、向细胞中含有重组质粒的BL21(DE3)细胞中加入500μL无菌的不含抗生素的LB培养基，混匀后置于37℃，200rpm离心培养2h，得到复苏的菌体；其中，菌体中含有具有Amp+抗性的重组质粒，复苏的目的是让Amp+抗性基因进行一定的数量表达，如果表达量过少或不够，该细胞就被Amp+直接杀死。

[0052] D3、吸取不同体积复苏的菌体涂布到固体LB培养基上，37℃培养16h；

[0053] E3、挑取在培养基上生长的菌落，进行PCR鉴定。

[0054] 本发明还有一种限定，步骤(3)的具体操作如下：

[0055] 将发酵培养的菌液用双蒸水稀释到OD值为0.800(OD值用紫外分光光度计进行检测)，以此来做为免疫菌苗注射液。

[0056] 由于采用了上述的技术方案，本发明与现有技术相比，所取得的技术进步在于：

[0057] 采用重组质粒的构建、基因的表达和菌苗的制备方法，该方法为禽类致病性大肠杆菌的预防提供了新的方法，具有十分重要的意义。本发明通过对禽致病性大肠杆菌质粒中功能基因的筛选，将具有粘附作用的tsh基因重组于大肠杆菌BL21(DE3)。该菌苗可以抢先一步和禽体细胞上的相应受体(即温度敏感血凝素受体)结合，致使禽致病性大肠杆菌无受体可以结合，从而减少禽类的发病。实验证明，该重组大肠杆菌BL21(DE3)具有良好的免疫效果，因此，此重组大肠杆菌BL21(DE3)可以用于禽大肠杆菌广谱性菌苗的开发。

[0058] 本发明适用于预防禽类大肠杆菌病广谱菌苗的制备。

[0059] 本发明下面将结合说明书附图和具体实施例作进一步详细说明。

附图说明

[0060] 图1为PCR扩增产物tsh基因的1％琼脂糖凝胶电泳图；

[0061] 图2为重组大肠杆菌Trans1-T1的构建流程图；

[0062] 图3为重组pEASY-E1载体的PCR鉴定结果；

[0063] 图4为重组大肠杆菌BL21(DE3)的PCR鉴定结果；

[0064] 图5为本发明所制备的预防禽类大肠杆菌病广谱菌苗作用位点示意图。

具体实施方式

[0065] 实施例

[0066] 本实施例为一种预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法，它按照以下步骤顺序进行：

[0067] (1)重组质粒的构建(重组大肠杆菌Trans1-T1的构建流程，如图2所示)

[0068] ①以禽致病性大肠杆菌基因组为模板，利用PCR技术对温度敏感血凝素tsh基因进行扩增；

[0069] 其中，步骤①中PCR扩增温度敏感血凝素tsh基因，使用的引物如下

[0070] 上游引物为zx1：5’-atgaacagaatttattctcttcgc-3’

[0071] 下游引物为zx2：5’-gaatgaataacgaatattagcgttt-3’。

[0072] PCR扩增温度敏感血凝素tsh基因具体过程如下：

[0073] 活化培养APEC菌株，并提取质粒，以提取的质粒作为PCR反应的模板；

[0074] 将扩增温度敏感血凝素tsh基因，96℃预变性5min，94℃变性1min；

[0075] 50℃退火30s(相同的条件下也可以为40s，50s或60s)，72℃延伸1min(相同的条件下也可以为1.5min或2min)，30个循环；

[0076] 72℃延伸10min后，置于4℃冰箱保存，即得扩增后的温度敏感血凝素tsh基因。

[0077] 其中，PCR扩增反应体系如表1所示：

[0078] 表1 PCR扩增反应体系

[0079]

反应物	用量
10×Buffer（含Mg2+）	2.5μL
2.5mmol/L dNTP	2.0μL
20mmol/L zx1	0.5μL
20mmol/L zx2	0.5μL
DNA模板	2.5μL
2.5U/mL Taq酶	0.5μL
ddH2O	16.5μL
总体积	25.0μL

[0080] 扩增结束后，取PCR产物进行1％琼脂糖凝胶电泳检测。电泳缓冲液为1×TAE，以120V电压电泳30min，用紫外检测仪观察电泳结果，见图1，图1中M为DL8000 Marker(指示范围为8000，5000，3000，1500，1000，500)；扩增得到的tsh片段长度4134bp，与预期大小相符，如图1所示。

[0081] ②将扩增后的温度敏感血凝素tsh基因插入到表达载体pEASY-E1上，构建重组质粒载体，再转化到Trans1-T1克隆感受态细胞中；

[0082] 具体操作如下：

[0083] A1、将PCR扩增后的温度敏感血凝素tsh基因、pEASY-E1载体和双蒸水混匀后置于25℃，保温20min，形成PCR产物和pEASY-E1载体构建的重组质粒；

[0084] 其中，所得PCR产物经1％琼脂糖凝胶电泳后，切割目的条带tsh，然后用DNA回收试剂盒回收PCR产物；将回收的PCR片段与表达载体pEASY-E1进行链接，5μL链接体系如下表所示：

[0085]

反应物	用量
PCR纯化产物	1μL
pEASY-E1载体	1μL
ddH2O	3μL
总体积	5μL

[0086] B1、加上述重组质粒于50μL Trans1-T1感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴10～15min；

[0087] C1、42℃热激30s后，立即置于冰上；

[0088] D1、后加入至温度为室温的LB培养基中，放进摇床，37℃下200rpm孵育1h，得菌液；

[0089] 其中，步骤D1所述的LB液体培养基配方包括：

[0090] Yeast extract 5g，Tryptone 10g，NaCl 5g，其余为双蒸水，定容至1L。

[0091] E1、取200μL菌液置于平板上进行铺板，培养过夜，即得含有重组质粒的Trans1-T1细胞；

[0092] 其中上述平板为用LB固体培养基置于培养皿中所制的平板，其中LB培养基中含有40mg/mL氨苄青霉素钠。所述的LB固体培养基配方包括：Yeast extract 5g，Tryptone 10g，NaCl 5g，琼脂10g，其余为双蒸水，定容至1L。

[0093] 挑取在培养基上生长的菌落，进行PCR鉴定(引物用zx1和T7terminator primer)，其中T7 terminator primer是T7下游引物，引物序列是：5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'。扩增结束后，取PCR产物进行1％琼脂糖凝胶电泳检测。电泳缓冲液为1×TAE，以120V电压电泳30min，用紫外检测仪观察电泳结果，如图3所示，图3中DL8000 Marker(指示范围为8000，5000，3000，1500，1000，500)；扩增得到的片段长度4221bp，与预期大小相符。委托六合华大基因检测机构进行测序鉴定，PCR扩增得到的tsh基因片段的测序结果如下所示：

[0094]

atgaacagaa tttattctct tcgctacagc gctgtggccc ggggctttat tgccgtatct

gagtttgcta ggaaatgtgt tcataagtct gtcagacgtc tgtgtttccc ggttttatta

ctgatcccgg tactattctc tgcaggaagt cttgcgggaa cggtcaataa tgaactcggg

tatcagttat ttcgtgattt tgctgaaaat aaggggatgt tccgcccggg ggcaacgaat

atcgctattt ataataagca gggagaattt gtcggtacgc tggataaggc agctatgcct

gatttcagtg ctgtggattc ggaaatcggt gtggcgacac tgataaaccc gcagtatatc

gccagcgtga aacataacgg gggatataca aacgttagct ttggtgatgg tgaaaaccgt

tacaatatcg tggaccggaa taatgcgccg tcactggatt ttcatgcccc ccggctgggt

aaactggtga cagaggttgc ccctactgcg gtgacggcgc agggggcagt ggctggcgca

tatctggata aggagcgcta tcctgttttt tatcgtctgg ggtctggtac tcagtatatt

aaggacagta acggacagct gacaaaaatg ggaggtgcat attcctggct gaccggcggg

actgtcggta gcctgtcatc ctatcagaat ggagaaatga ttagcaccag ttcaggtctg

gtttttgatt acaaacttaa tggtgcaatg cccatttatg gcgaggccgg tgacagcggt

tcgcctttat ttgcttttga tactgttcag aataaatggg tgctggtcgg tgttcttact

gcggggaatg gcgcgggggg caggggaaat aactgggctg ttattccact ggattttatc

gggcagaaat ttaatgaaga caatgatgcc ccggtcacgt tcagaacatc ggaaggtggt

gcactggagt ggagctttaa cagcagtacc ggagctggtg cgctgacaca gggaaccacc

acatatgcca tgcacgggca gcagggaaat gacctgaatg ctggtaagaa cctgatattt

caggggcaga atggtcagat taaccttaag gattcggttt ctcaggggge gggttccctg

acgttccgtg ataattacac agtaacaacc tctaacggaa gtacctggac cggtgccggt

attgttgtgg acaacggggt gtccgtaaac tggcaggtta atggtgttaa gggcgataac

ctgcataaaa ttggtgaagg tacgctgacg gtacagggta caggtattaa tgaaggtggc

ctgaaggtcg gggacggaaa ggttgtactg aaccagcagg cggacaataa aggacaggtg

caggcgttca gcagtgttaa tattgccagt ggccggccga ccgtggtact gactgatgag

[0095]

cggcaggtaa atccggatac cgtctcatgg ggatatcgtg ggggcacact ggatgttaat

ggtaacagtc tgacgtttca tcagttgaag gcggcagatt atggtgccgt gctggcgaat

aacgttgata aacgggccac tatcacgctg gactatgccc tgcgggctga caaagtagca

ctgaatggct ggtcggaatc aggtaaagga actgccggaa atttatataa atacaataac

ccgtacacaa atacgacgga ttacttcatc ctgaagcaga gcacctatgg ttatttcccc

acggaccaga gcagcaacgc cacctgggag tttgtggggc acagtcaggg ggatgcacag

aaactggtag ctgaccgttt caatactgca gggtatctgt ttcacggaca actgaaaggc

aatctgaatg tggacaatcg cctgcctgaa ggcgttaccg gtgctctggt gatggacgga

gctgcggata tctccggtac attcacccag gaaaacgggc gtctgacgct gcaggggcat

ccggttatcc atgcatacaa tactcagtct gtggctgaca aactggctgc cagtggagac

cattcggttc tgactcagcc tacgtcattc agtcaggagg actgggagaa ccgcagtttt

acctttgaca ggctgtcact gaagaacact gattttggtc ttggtcgcaa tgccacactg

aacacaacca tccaggcaga taactccagc gtcacgctgg gcgacagccg ggtatttatc

gacaaaaacg atggccaggg aacagccttt acccttgaag aaggcacatc tgttgcaact

aaagatgcag ataaaagtgt cttcaacggc accgtcaacc tggataatca gtcagtgctg

aatatcaatg atatattcaa tggcggaata caggcgaaca acagtaccgt gaatatctcc

tcagacagtg ccgttctggg gaactcaaca ctgaccagta ccgccctgaa tctgaacaag

ggagcaaatg ctctggccag tcagagtttt gtttctgacg gtccagtgaa tatttctgat

gccaccctga gtctgaacag ccgtcctgat gaggtatctc acacactttt acctgtatac

gattatgccg gttcatggaa cctgaaggga gacgatgccc gcctgaacgt ggggccgtac

agtatgttgt caggtaatat caatgttcag gataaaggga ctgtcaccct cggaggggaa

ggggaactga gtcctgacct gactcttcag aatcagatgt tgtacagcct gtttaacggg

taccgcaata tctggagcgg gagcctgaat gcaccggatg ccaccgtcag catgacagac

acccagtggt cgatgaacgg aaactccacg gcaggaaata tgaaacttaa ccggacaata

[0096]

gtcggtttta acgggggaac atcaccgttc acgacactga caacagataa tctggacgcg

gttcagtcag catttgtcat gcgtacagac cttaacaagg cagacaaact ggtgataaac

aagtcggcaa caggtcatga caacagcatc tgggttaact tcctgaaaaa accttctaac

aaggacacgc ttgatattcc actggtcagc gcacctgaag cgacagctga taatctgttc

agggcatcaa cacgggttgt gggattcagt gatgtcaccc ccatccttag tgtcagaaaa

gaggacggga aaaaagagtg ggtcctcgat ggttaccagg ttgcacgtaa cgacggccag

ggtaaggctg ccgccacatt catgcacatc agctataaca acttcatcac tgaagttaac

aacctgaaca aacgcatggg cgatttgagg gatattaatg gcgaagccgg tacgtgggtg

cgtctgctga acggttccgg ctctgctgat ggcggtttca ctgaccacta taccctgctg

cagatggggg ctgaccgtaa gcacgaactg ggaagtatgg acctgtttac cggcgtgatg

gccacctaca ctgacacaga tgcgtcagca gacctgtaca gcggtaaaac aaaatcatgg

ggtggtggtt tctatgccag tggtctgttc cggtccggcg cttactttga tgtgattgcc

aaatatattc acaatgaaaa caaatatgac ctgaactttg ccggagctgg taaacagaac

ttccgcagcc attcactgta tgcaggtgca gaagtcggat accgttatca tctgacagat

acgacgtttg ttgaacctca ggcggaactg gtctggggaa gactgcaggg ccaaacattt

aactggaacg acagtggaat ggatgtctca atgcgtcgta acagcgttaa tcctctggta

ggcagaaccg gcgttgtttc cggtaaaacc ttcagtggta aggactggag tctgacagcc

cgtgccggcc tgcattatga gttcgatctg acggacagtg ctgacgttca tctgaaggat

gcagcgggag aacatcagat taatggcaga aaagacagtc gtatgcttta cggtgtgggg

ttaaatgccc ggtttggcga caatacgcgt ctggggctgg aagttgaacg ctctgcattt

ggtaaataca acacagatga tgcgataaac gctaatattc gttattcatt ctga

[0097] ③对Trans1-T1克隆感受态细胞进行培养，并提取质粒；

[0098] 具体操作如下：

[0099] A2、挑取单克隆菌落于1.5mL LB培养基中，37℃下300rpm离心18h；

[0100] B2、取离心菌液进行离心操作，离心力为10000g，离心时间为1min，弃去上清液，流下菌体沉淀；

[0101] C2、向菌体沉淀中加入250μL的Solution I，漩涡2min，得到溶液a；

[0102] D2、向溶液a中加入250μL的Solution II，旋转离心管轻轻混匀，孵育3min，得到溶液b；

[0103] E2、向溶液b中加入350μL Solution III，混合立即颠倒几次，直到出现絮状物沉淀，得到溶液c；

[0104] F2、将溶液c在13000g下离心10min，得到上清液和白色沉淀物；

[0105] G2、向2mL带有离心柱的离心管中，加入100μL平衡液，13000g离心60s，弃去流出液；

[0106] H2、小心吸取F2步得到的上清液于离心管中，13000g离心1min，弃去流出液；

[0107] I2、加入500μL HB Buffer，13000g离心60s，弃去流出液；

[0108] J2、加入700μL DNA wash buffer，13000g离心60s，弃去流出液；

[0109] K2、重复步骤J2，弃去流出液；

[0110] L2、13000g离心2min，彻底去除液体，得到含有质粒DNA的离心柱；其中步骤G2-L2操作时均在带有离心柱的离心管中操作，H2-L2操作时离心柱中含有质粒的DNA；

[0111] M2、将含有质粒DNA的离心柱加入到干净的1.5mL的离心管中，加入50μL EB进行洗脱，室温孵育60s，13000g离心60s，收集DNA，得到重组质粒。

[0112] 其中，所述的步骤C2中所述的Solution I、步骤D2中所述的Solution II、步骤E2中所述的Solution III、步骤G2中所述的平衡液、步骤12中所述的HB Buffer和步骤J2中所述的DNA wash buffer均为Plasmid Mini Kit I D6943-01*型号的试剂盒中的组成。

[0113] (2)基因的表达

[0114] 将质粒转化到感受态细胞BL21(DE3)中，对感受态细胞BL21(DE3)进行培养；

[0115] 具体操作如下：

[0116] A3、取50μL冰浴上融化的BL21(DE3)感受态细胞，加入重组质粒中，轻轻摇匀，在冰浴中放置30min，得到细胞膜上结合有重组质粒的BL21(DE3)细胞；

[0117] B3、将细胞膜上结含有重组质粒的BL21(DE3)细胞42℃水浴条件下热激45s，然后快速平稳的转移到冰浴中2min，得到细胞中合有重组质粒的BL21(DE3)细胞；

[0118] C3、向细胞中合有重组质粒的BL21(DE3)细胞中加入500μL无菌的不含抗生素的LB培养基，混匀后置于37℃，200rpm培养2h，得到复苏的菌体；其中，菌体中含有具有Amp^+抗性的重组质粒，复苏的目的是让Amp^+抗性基因进行一定的数量表达，如果表达量过少或不够，该细胞就被Amp^+直接杀死。

[0119] D3、吸取不同体积复苏的菌体涂布到固体LB培养基上，37℃培养16h；

[0120] E3、挑取在培养基上生长的菌落，进行PCR鉴定，(引物用zx1和T7 terminator primer)其中T7terminator primer是T7下游引物，引物序列是：5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'，用1％琼脂糖凝胶电泳，电泳结果如图4所示。

[0121] (3)菌苗的制备

[0122] 将培养后的感受态细胞BL21(DE3)用双蒸水稀释到OD值0.800，OD值用紫外分光光度计进行检测，最终制得预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗；

[0123] 本发明所制备的预防禽类大肠杆菌病广谱菌苗作用位点如图5所示，将上述制得的预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗进行动物试验：

[0124] 选取实验动物为90只体重相近的0日龄(即为刚孵化出的)海兰褐雏鸡,随机平均分成3组,预饲7天后,进行试验。

[0125] 1、空白对照组:皮下注射1mL生理盐水,10天后腹腔注射1mL APEC菌液;

[0126] 2、禽大肠杆菌病广谱菌苗试验组(未接种APEC菌液):皮下注射1mL禽大肠杆菌病广谱菌苗;

[0127] 3、禽大肠杆菌病广谱菌苗+APEC菌液试验组:皮下注射1mL禽大肠杆菌病广谱菌苗,10天后腹腔注射1mL APEC菌液。

[0128] 试验结果为1组30只雏鸡全部死亡;2和3组雏鸡正常,无死亡,具体如下表所示:

[0129]

组别	雏鸡死亡数目(只)	
	10天之前	10天之后
1	0	30
2	0	0
3	0	0

[0130] 上述试验结果表明:本菌苗具有免疫禽机体的能力,能够有效的预防禽类大肠杆菌病的传播,使禽类不再感染疾病。

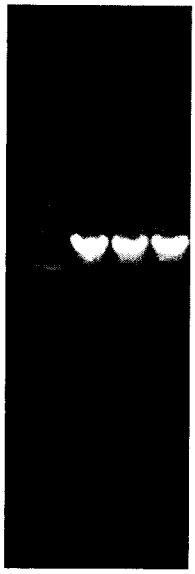


图1

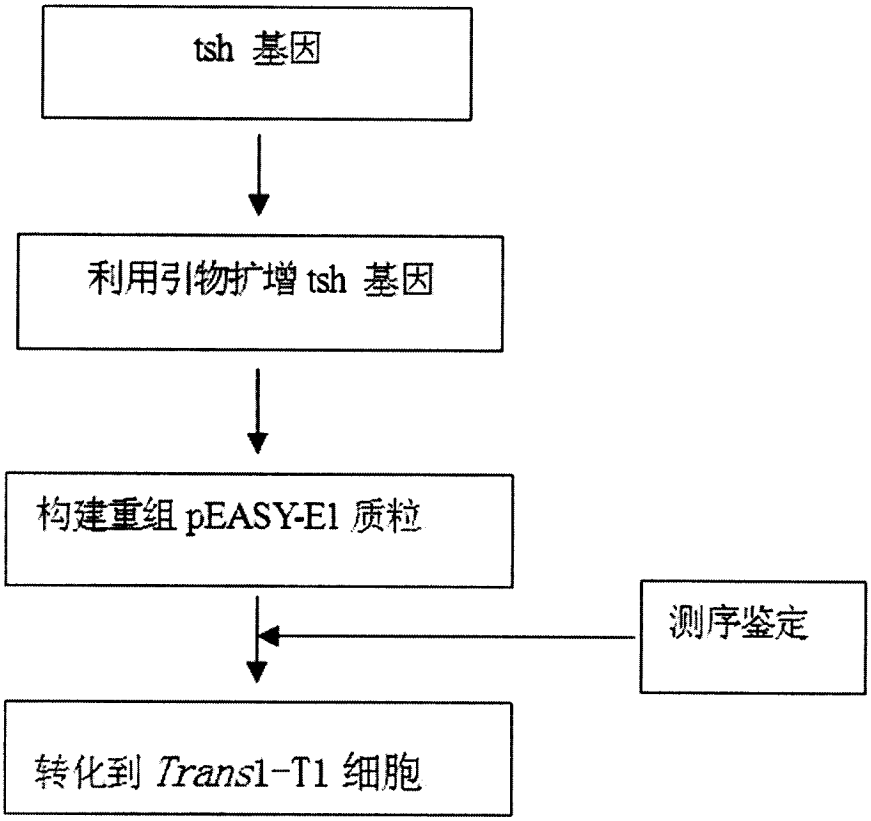


图2

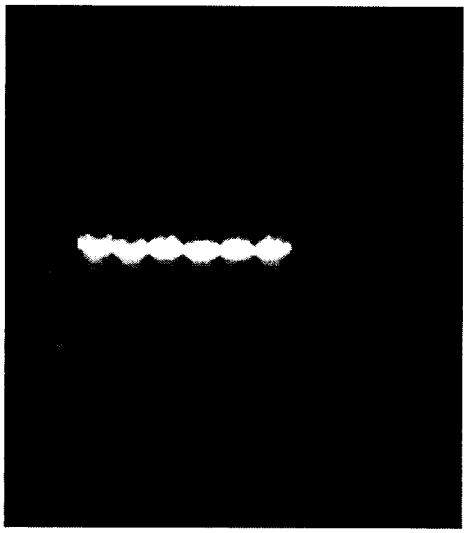


图3

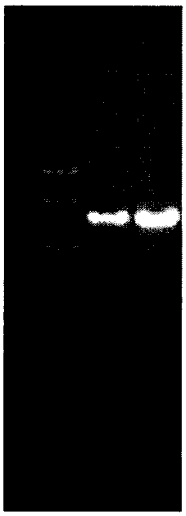


图4

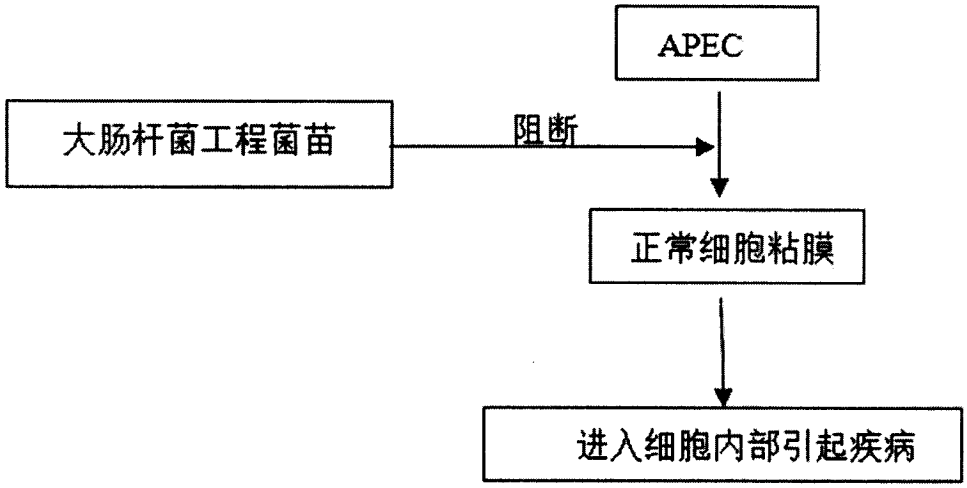


图5