

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 02155222.3

C12N 15/13

C12N 15/11

C12N 15/63

A61K 31/7088

A61K 39/00

A61P 15/00

C12P 19/34

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1200103C

[22] 申请日 2000.6.23 [21] 申请号 02155222.3

分案原申请号 00107831.3

[71] 专利权人 成都瑞盛高科技有限责任公司

地址 610041 四川省成都市高新区高朋东路 3 号 21D

[72] 发明人 吉传义 杜念兴 朱杰青 龚光明

王 凌 龚晓明

审查员 王青华

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

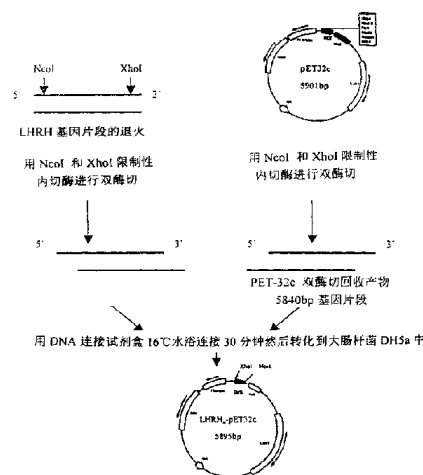
代理人 钱宝英

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

[54] 发明名称 家禽用去势重组基因载体

[57] 摘要

本发明家禽用去势重组基因载体，用于生产家畜家禽去势基因工程亚单位疫苗，属于生物技术高科技领域。其方法如下：人工合成畜用、禽用或畜禽通用的 LHRH 基因片段，其 5'端和 3'端分别加有 NcoI 和 XhoI 酶切位点，插入 pET-32c 质粒，构建成 4 种表达 LHRH-Trx 融合蛋白的 pET-32c LHRHn-N/X 重组质粒。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)，表达产物为可溶性蛋白，便于提取纯化，家畜、家禽通用，免疫鸡、猪、羊、兔、犬、猫等动物，可有效去势。图为重组质粒 pET-32c LHRHn(L1、L2、L3、L4)-N/X 的构建。



1. 家禽用去势重组基因载体, 是通过以下方法构建获得的:

1) LHRH 基因片段的退火

人工合成的家禽用去势疫苗基因片段 L2:

5' -GGCCATGGCTGAGCACTGGTCTTACGGCCTGCAGCCGGGT

TAATGAACTCGAGCA-3'

终止子 XhoI

将人工合成的家禽用去势疫苗基因片段的正链和负链, 分别用灭菌超纯溶解成浓度为 100pmol/l 的溶液, 各取 2 μ l 加入 72 μ l 超纯水中混匀, 置沸水浴中 2min 后缓慢冷却至室温, -20℃冻存备用;

2) LHRH 基因的酶切

用 NcoI 及 XhoI 对退火后的 LHRH 基因进行双酶切, 酶切产物直接用于连接反应;

3) pET-32c 质粒的提取、酶切及回收

pET-32c 质粒的提取后, 用 NcoI 及 XhoI 对 PET-32c 质粒进行双酶切; 取 10 μ l 酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 回收酶切大片段, 置液氮中冻 5min, 而后置 37℃水浴融化, 10000r/min 离心 10min, 吸取上清-20℃冻存备用;

4) 连接

DNA 连接反应体系如下:

PET-32c 双酶切回收产物 2.5 μ l

LHRH 基因酶切产物 7.5 μ l

DNA Ligation Kit Solution I 10 μ l

上述混合物 16℃反应 30min 后立即用于转化;

5) 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备;

6) 转化

取 10 μ l 连接产物转化 200 μ l DH5 α 感受态细胞, 取 200 μ l 转化产物涂布含 Amp 50 μ g/ml 的 LB 琼脂平板, 平板置 37℃温箱中培养 18 小时, 挑取转化后的单个菌落, 接种含 Amp 的 LB 肉汤扩大培养后提取质粒, 即为重组质粒。

家禽用去势重组基因载体

本申请为申请日：2000.6.23，申请号：00107831.3，名称：动物去势疫苗基因及基因工程体的分案申请。

（一）技术领域

本发明动物去势重组基因载体，用于生产家畜家禽去势用促黄体素释放激素（LHRH）基因工程亚单位疫苗，属于生物技术高科技领域。

（二）技术背景

促黄体素释放激素（Luteinizing hormone releasing hormone, LHRH）是由动物下丘脑分泌的一种十肽激素，其主要生物学功能是控制脑下垂体前叶细胞合成和分泌促黄体激素（LH）及促卵泡激素（FSH），这些激素能促进性腺及性器官的正常发育，维持动物的生殖功能。去势疫苗可免疫调控动物内分泌系统的性相关激素水平，抑制动物性器官发育，使动物丧失性行为 and 性功能，从而防止混乱交配（引起畜群退化）和争斗，促进动物生长，改善胴体组成和肉质（使肉质鲜嫩并防止膻味），提高饲料报酬。其机理是通过 LHRH 合成抗原或重组抗原作疫苗免疫动物后，在体内形成 LHRH 抗体，中和内源性 LHRH，从而显著降低睾酮及雌激素等性激素水平，达到温和去势的目的。与传统手术去势相比，疫苗去势不仅简便易行，给管理上带来极大的方便，尤其适合于规模化养殖和放牧畜群，而且可防止手术去势导致的出血、感染及应激造成的减食和体重下降，另外疫苗去势可适用于大动物或小动物（鸡等小动物手术较困难）、雌性或雄性动物、幼龄和成年动物、畜禽和其他动物，再者疫苗去势可通过配套技术实现可逆性控制。

通过免疫方法促使动物产生抗 LHRH 的抗体，以中和 LHRH 的生理作用，从而抑制性腺的发育以达到去势的目的，其可行性已被国内外许多学者证实，但大多数研究都集中在合成肽疫苗，虽然免疫效果显著，终因成本太高而无法进入实际应用。王彩平等将 LHRH/HBsAg 融合蛋白在家蚕杆状病毒中进行表达，但也因表达产量低，提纯工艺繁琐而未能推广应用。

（三）发明内容

技术问题 本发明的目的是利用动物去势疫苗基因，构建能高效表达 LHRH 融合蛋白的动物去势重组基因载体，可以用于研制高产、优质、高效、低成本、

工艺简便, 适合规模生产、使用方便, 而且安全性高, 无残留, 无潜在危险的动物去势基因工程疫苗, 免疫动物, 替代传统的手术去势。

技术方案 本发明所提供的动物去势疫苗基因, 其通式为:

5' --保护性碱基--限制性酶切位点--框架保证碱基--LHRH 基因--终止子--
限制性酶切位点--保护性碱基--3'

其中, 保护性碱基可以是 A、T、G、C 任选;

限制性酶切位点是指 Nco I、EcoR I、HindIII、Xho I、BamH I 等限制性酶的切点;

框架保证碱基可以是 A、T、G、C 任选;

LHRH 基因是指家畜 LHRH 基因, 或者是家禽 LHRH 基因, 或者是 LHRH 基因和家禽 LHRH 基因串联。

上述动物去势疫苗基因, 例举具体的基因序列如下:

家畜用去势疫苗 LHRH 基因序列——L1:

5' -GGCCATGGCTGAGCATTGGTCTTATGGCCTGCGCCCAGGT
TAATGAACTCGAGCA-3'

终止子 Hho I

家禽用去势疫苗 LHRH 基因序列——L2:

5' -GGCCATGGCTGAGCACTGGTCTTACGGCCTGCAGCCGGGT
TAATGAACTCGAGCA-3'

终止子 Xho I

畜/禽通用去势疫苗 LHRH 基因序列之 1——L3:

5' -GGCCATGGCTGAACACTGGTCCTACGGTCTGCGTCCGGGT
GGCGGTGAGCACTGGTCTTACGGCCTGCAGCCGGGTGGCGGTGAACATTG
GTCTTACGGTCTGCGCCCGGGTTAATGAACTCGAGCA-3'

终止子 Xho I

畜/禽通用去势疫苗 LHRH 基因序列之 2——L4:

5' -GGCCATGGCTGAACACTGGTCCTACGGTCTGCGTCCGGGT
Nco I

GGCGGTGAGCACTGGTCTTACGGCCTGCAGCCGGGTGGCGGTGAACA
TTGGTCTTACGGTCTGCGCCCGGGTGGCGGTGAGCACTGGTCTTACGGCC
TGCAGCCGGGTGGCGGTGAACACTGGTCCTACGGTCTGCGTCCGGGTGGC

GGTGAGCACTGGTCTTACGGCCTGCAGCCGGGTGGCGGTGAACATTGGTC

TTACGGTCTGCGCCCGGGTAAATGAACTCGAGCA-3'

终止子 Xho I

用上述动物去势疫苗基因构建的重组基因载体, pET-32c LHRHn-N/X 重组表达质粒, 是通过以下方法构建获得的:

1. LHRH 基因片段的退火

将人工合成的动物去势疫苗基因片段的正链和负链, 分别用灭菌超纯水溶解成浓度为 100pmol/ μ l (相当于 1.82 μ g/ μ l) 的溶液, 各取 2 μ l 加入 72 μ l 超纯净水中混匀, 置沸水浴中 2min 后缓慢冷却至室温, -20℃冻存备用;

2. LHRH 基因的酶切

用 NcoI 及 XhoI 对退火后的 LHRH 基因进行双酶切, 酶切产物直接用于连接反应;

3. pET-32c 质粒的提取、酶切及回收

pET-32c 质粒的提取后, 用 NcoI 及 XcoI 对 pET-32c 质粒进行双酶切。取 10 μ l 酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 回收酶切大片段, 置液氮中冻 5min, 而后置 37℃水浴中融化, 10000r/min 离心 10min, 吸取上清-20℃冻存备用;

4. 连接

DNA 连接反应体系如下:

PET-32c 双酶切回收产物 2.5 μ l

LHRH 基因酶切产物 7.5 μ l

DNA Ligation Kit Solution I 10 μ l

上述混合物 16℃反应 30min 后立即用于转化;

5. 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备;

6. 转化

取 10 μ l 连接产物转化 200 μ l 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 取 200 μ l 转化产物涂布含 Amp 50 μ g/ml 的 LB 琼脂平板, 平板置 37℃温箱中培养 18 小时, 挑取转化后的单个菌落, 接种含 Amp 的 LB 肉汤扩大培养后提取质粒, 即为重组基因载体 pET-32c LHRHn-N/X 重组质粒。

有益效果 本发明所提供的动物去势重组基因载体, 可高效表达 LHRH-Trx 融合蛋白 (表达量 30%以上), 用于生产家畜家禽去势用促黄体素释放激素 (LHRH) 基因工程亚单位疫苗。 由于鸟类和哺乳动物的 LHRH 有一个氨基

酸不同,分别构建了表达鸟类、哺乳类及不同数量鸟类/哺乳类相间串联的 LHRH 基因的重组表达质粒 (L1、L2、L3、L4)。经检验测试,本发明所提供的重组基因载体,在表达量、免疫原性、生产简便性、去势有效性、安全性、成本等各方面均符合产业化要求。用其制造疫苗,生产简易,成本低廉,安全有效。4 种质粒中, L1 表达产物对家畜有效, L2 对家禽有效, L3 及 L4 家畜家禽通用, L4 免疫产生期及免疫持续期等方面的效力又优于 L3, 可根据各种不同的应用需要加以选择。

采用该工程体在实验室条件下生产 L1、L2、L3 和 L4 苗样各 3 批,其表达产量稳定,表达产物蛋白量均达菌体总蛋白量的 30%以上。表达产物均稳定具有良好的免疫原性,表现在:(1)表达产物与 Sigma 公司的 LHRH 标准抗体发生特异性反应;(2)免疫动物后能有效激发产生高效价的 LHRH 抗体,该抗体能在体外试验中与 LHRH 发生特异性反应。共免疫小鼠 210 只,兔 50 只,土鸡 30 只,猪 640 头,猫 6 只,狗 4 只,免疫动物后均能有效激发抗体,性成熟期观测,在性行为、性功能、性激素水平、性器官发育抑制等各方面综合评定,可有效去势,明显改善肉质,并可明显促进增重和提高饲料报酬。以公兔为例,免疫组平均睾丸重量为 $1.32 \pm 0.38\text{g}$,对照组平均睾丸重为 $3.18 \pm 0.47\text{g}$,组织学观察证实,免疫组睾丸实质萎缩,多无精子形成能力(个别有精子,但活检时没有活力)。

(四)附图说明

图 1.重组质粒 pET-32c LHRH_n (L1、L2、L3、L4) -N/X 的构建

图 2.不同 IPTG 浓度诱导对 LHRH₁-Trx (L1) 融合蛋白表达产量的影响

1. 0mM IPTG 2. 0.05mM IPTG 3. 0.1mM IPTG
4. 0.5mM IPTG 5. 1.0mM IPTG 6. 2.0mM IPTG
7, 8, 9. 2.0mM IPTG (不同诱导时间) M. 蛋白质分子量标志

图 3.多次转化表达 LHRH₃-Trx (L3) 融合蛋白产量均高效稳定 (1mM IPTG 诱导 4h)

图 4.LHRH₁-Trx (L1) 融合蛋白免疫后的家兔睾丸大小变化

1,2. LHRH-Trx (L1) 融合蛋白皮内注射组 3,4. LHRH-Trx 融合蛋白肌肉注射组

5,6. PET-32c 载体蛋白免疫组 7,8. 空白对照组

图 5. LHRH₁-Trx (L1) 融合蛋白免疫后的家兔睾丸组织学变化

A. 正常对照兔睾丸组织切片 B. 表达产物免疫兔睾丸组织切片

(五)具体实施方式

实施例：

1. LHRH 基因的设计和人工合成

根据鸟类、哺乳类 LHRH 的氨基酸序列设计基因，在 5' 端和 3' 端分别加上 NcoI 和 XhoI 两个酶切位点及保护性碱基，用 DNA 自动合成仪合成基因。

1.1. 家畜用疫苗 LHRH 基因序列——L1：

5' -GGCCATGGCTGAGCATTGGTCTTATGGCCTGCGCCAGGT
TAATGAACTCGAGCA-3'

终止子 XhoI

1.2. 家禽用疫苗 LHRH 基因序列——L2：

5' -GGCCATGGCTGAGCACTGGTCTTACGGCCTGCAGCCGGGT
TAATGAAC TCGAGCA-3'

终止子 XhoI

1.3. 畜/禽通用疫苗 LHRH 基因序列之 1——L3：

5' -GGCCATGGCTGAACACTGGTCCTACGGTCTGCGTCCGGGT
GGCGGTGAGCACTGGTCTTACGGCCTGCAGCCGGGTGGCGGTGAACATTG
GTCTTACGGTCTGCGCCCGGGTTAATGAACTCGAGCA-3'

终止子 XhoI

1.4. 畜/禽通用疫苗 LHRH 基因序列之 2 ——L4：

5' -GGCCATGGCTGAACACTGGTCCTACGGTCTGCGTCCGGGT
GGCGGTGAGCACTGGTCTTACGGCCTGCAGCCGGGTGGCGGTGAACA
TTGGTCTTACGGTCTGCGCCCGGGTGGCGGTGAGCACTGGTCTTACGGCC
TGCAGCCGGGTGGCGGTGAACACTGGTCCTACGGTCTGCGTCCGGGTGGC
GGTGAGCACTGGTCTTACGGCCTGCAGCCGGGTGGCGGTGAACATTGGTC
TTACGGTCTGCGCCCGGGTTAATGAACTCGAGCA-3'

终止子 XhoI

2. LHRH 基因克隆（图 1）

2.1. LHRH 基因片段的退火

将人工合成的动物去势疫苗基因片段的正链和负链，分别用灭菌超纯水溶解成浓度为 100pmol/ μ l（相当于 1.82 μ g/ μ l）的溶液，各取 2 μ l 加入 72 μ l 超纯水中混匀，置沸水浴中 2min 后缓慢冷却至室温，-20℃冻存备用。

2.2. LHRH 基因的酶切

用 NcoI 及 XhoI 对退火后的 LHRH 基因进行双酶切。酶切产物直接用于连接反应。

2.3. pET-32c 质粒的提取、酶切及回收

pET-32c 质粒的提取用碱裂解法, 参照文献[美]J. 萨姆布鲁克等著,《分子克隆实验指南》介绍的方法。用 NcoI 及 XhoI 对 pET-32c 质粒进行双酶切。取 10 μ l 酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 回收酶切大片段, 置液氮中冻 5min, 而后置 37℃水浴中融化, 10000r/min 离心 10min, 吸取上清-20℃冻存备用。

2.4. 连接

DNA 连接反应体系如下:

pET-32c 双酶切回收产物	2.5 μ l
LHRH 基因酶切产物	7.5 μ l
DNA Ligation Kit Solution I	10 μ l

上述混合物 16℃反应 30min 后立即用于转化。

2.5. 感受态细胞的制备

参照文献[美]J. 萨姆布鲁克等著,《分子克隆实验指南》介绍的方法制备大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。

2.6. 转化

取 10 μ l 连接产物转化 200 μ l DH5 α 感受态细胞, 具体操作参照文献[美]J. 萨姆布鲁克等著,《分子克隆实验指南》介绍的方法进行。取 200 μ l 转化产物涂布含 Amp 50 μ g/ml 的 LB 琼脂平板, 同时设未转化的感受态细胞对照(阴性对照)及 pET-32c 质粒转化的感受态细胞对照(阳性对照)。平板置 37℃温箱中培养 18 小时。

2.7. 重组质粒的酶切筛选

pET-32c 质粒多克隆位点有 EcoRI 及 HindIII 酶切位点, 当插入 LHRH 基因后这两个酶切位点应该消失, 而 NcoI 和 XhoI 酶切位点仍然存在。据此原理, 挑取转化后的单个菌落, 接种含 Amp 的 LB 肉汤扩大培养后提取质粒, 分别用 HindIII、EcoRI、NcoI 及 XhoI 进行单酶切, 挑选 HindIII 及 EcoRI 酶切位点消失而 NcoI 及 XhoI 酶切位点仍存在的阳性克隆。

2.8. 重组质粒的序列测定

挑选经酶切鉴定的重组质粒, 以 T7 Terminator primer 作为测序引物, 由宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定。

3. pET-32c LHRH_n-N/X 重组质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达

3.1. BL21 (DE3) 感受态细胞的制备

方法同 1.2.5。

3.2. 转化

用碱裂解法小量提取经序列测定的重组质粒及 pET-32c 质粒分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞，方法同 2.6。

3.3. 重组质粒在 BL21 (DE3) 中的表达

挑取重组质粒转化菌落接种 5ml 含 Amp 50 μ g/ml 的 LB 肉汤，37℃ 摇震培养过夜（转速为 250rpm，下同），次日按 1% 接种量接种于 30ml 含 Amp 50 μ g/ml 的 LB 肉汤中，于 37℃ 摇床中培养至 OD₆₀₀ 达 0.5 左右，取出 1ml 菌液置 Eppendorf 管中 2000r/min 离心 1min，弃上清于 -20℃ 冻存备用，作为诱导前对照，其余培养物加入终浓度为 1mM 的 IPTG 进行诱导表达 3-4 小时，取 1ml 诱导后菌液同样离心弃上清保留沉淀。同时对 pET-32c 质粒转化菌进行同样操作作为对照。

3.4. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

将诱导前菌体，诱导后重组质粒转化菌及诱导后 pET-32c 载体质粒转化菌沉淀用蒸馏水重悬加等体积的 2× 载体 buffer，煮沸 5min，各取 10 μ l 进行不连续 SDS-PAGE（浓缩胶 5%，分离胶 13%）。电泳结束后，凝胶用考马斯亮蓝 (R250) 进行染色。用凝胶成像处理系统进行条带灰度扫描，测定表达融合蛋白与菌体总蛋白之比。

3.5. 表达蛋白的可溶性

将 LHRH-pET-32c 质粒转化菌过夜培养物按 1% 接种量接种 100ml LB 肉汤，37℃ 摇床培养至 OD₆₀₀=0.5 左右时，加入 IPTG 至终浓度 1mM，继续培养 4h 后，离心弃上清，全部菌体沉淀用 10ml PBS (pH7.4) 重悬，超声波破碎（冰浴）5min，超声功率为 240W，离心后将上清转移至另一容器中，沉淀用 10ml PBS 重悬，各取 50 μ l 上清及沉淀悬液加入等体积的 2× 载样 buffer，进行 SDS-PAGE；同时，对 pET-32c 质粒转化菌进行上述同样操作作对照。另外设未用超声波裂解的全菌对照。对凝胶进行灰度扫描确定目的蛋白的含量。

4. LHRH-Trx 融合蛋白的免疫原性鉴定

4.1. 试验动物

小鼠 200 只，兔 50 只，土鸡 30 只，猪 600 头，猫 6 只，狗 4 只。

4.2. 免疫方案：

将表达产物用弗氏佐剂及白油佐剂等配制疫苗，通过皮内注射和肌肉注射等免疫途径注射动物，免疫剂量 0.2-2ml 不等，视动物体重大小而定。一般在动物性成熟前免疫。

4.3. 免疫动物性功能及性器官检查

4.3.1. 性功能检查

在性成熟期后，将试验动物与同种异性健康成年动物合养，观察性行为、性征及繁殖能力等情况。

4.3.2. 性腺、性器官检查

剖解检查，采集睾丸、卵巢，其一立即置中性福尔马林中固定，作组织切片分析，其二称重、测量大小和检查睾丸有无精子及精子活力等。

结果分析：

1. 四种能稳定、高效表达 LHRH-Trx 融合蛋白的重组质粒

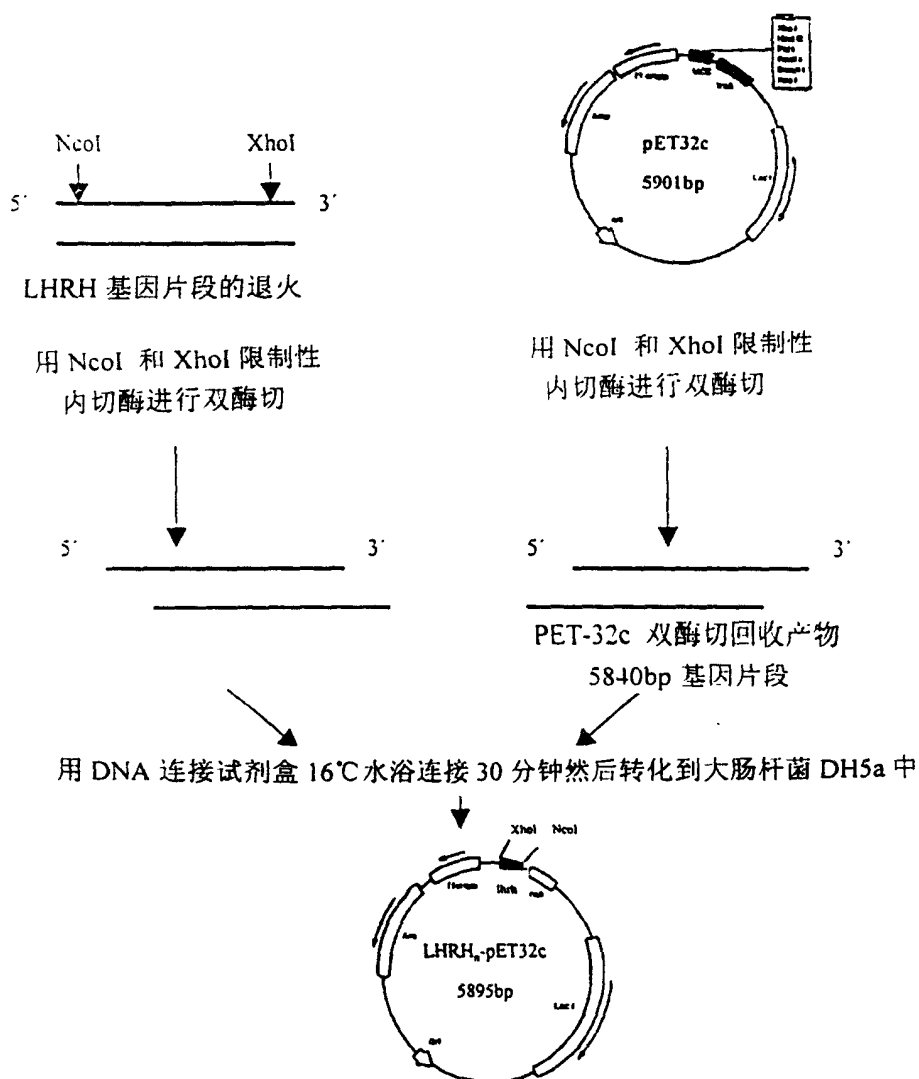
构建了表达鸟类、哺乳类及不同数量鸟类/哺乳类相间串联的 LHRH 融合蛋白的 4 种重组表达质粒。序列分析表明基因合成和插入正确。质粒经保存后多次转化大肠杆菌，表达量及表达产物的免疫原性均很稳定，表达水平始终在菌体总蛋白的 30%以上。

2. 可溶性的表达产物

实现了 LHRH-Trx 融合蛋白的可溶性表达，表达产物几乎完全以可溶性形式存在（而非包涵体）。用渗透休克方法对 LHRH 融合蛋白及 pET-32c 载体蛋白进行提取，结果 LHRH 重组菌经高渗处理后能将 LHRH-Trx 融合蛋白单一地释放出来，而且纯度达 90%以上，而 pET-32c 空载体蛋白仍存在于菌体中不能释放出来。为提取和纯化表达产物制备疫苗提供了极大的方便。

3. 表达产物有很强的 LHRH 抗原性

表达产物和 LHRH 抗体有很好的反应性，该反应能被 LHRH 标准品阻断；免疫动物能有效激发 LHRH 抗体，中和内源性 LHRH，从而显著降低睾酮及 FSH 等性激素水平，达到温和去势的目的，而且，疫苗免疫可防止手术去势导致的出血、感染及应激造成的减食和体重下降。



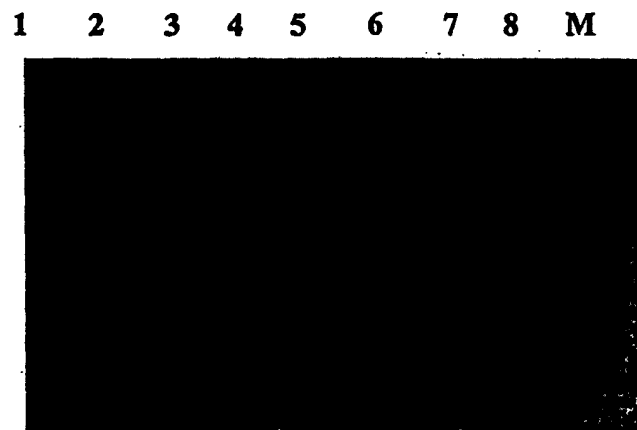


图 2

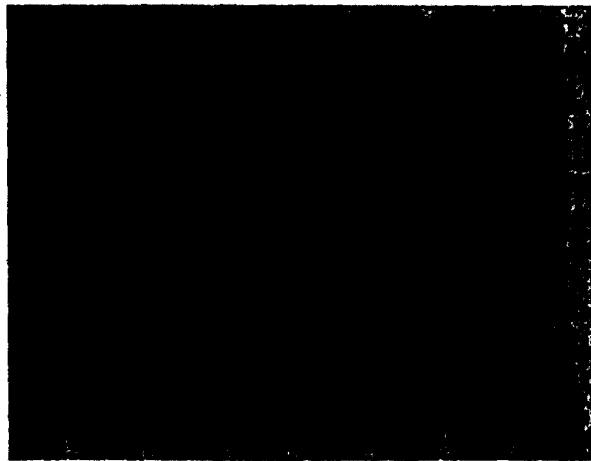


图 3

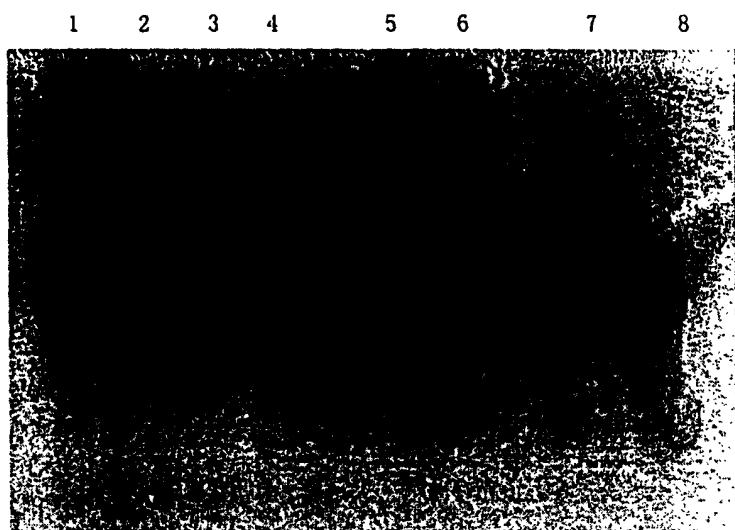


图 4

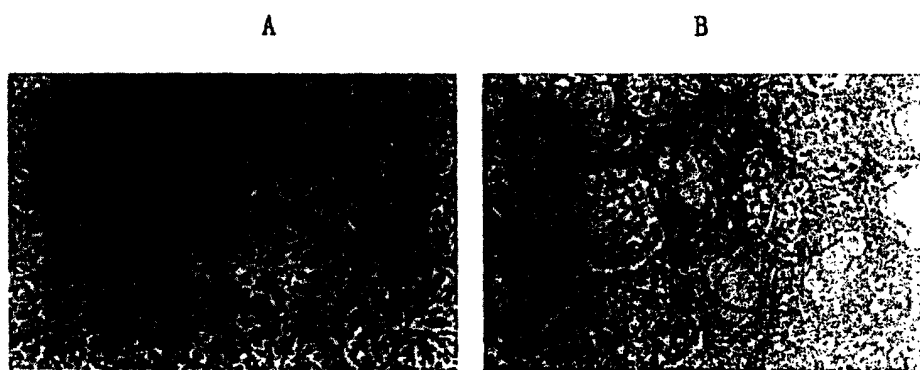


图 5