

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610134444. X

[51] Int. Cl.

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 47/44 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 6 月 4 日

[11] 公开号 CN 101190332A

[22] 申请日 2006. 12. 1

[21] 申请号 200610134444. X

[71] 申请人 中国科学院海洋研究所

地址 266071 山东省青岛市南海路 7 号

[72] 发明人 莫照兰 肖 鹏 邹玉霞 王 波
徐永立 张培军

[74] 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司
代理人 许宗富 周秀梅

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种鳃弧菌油乳化二价口服疫苗及其制备

[57] 摘要

本发明涉及鱼用疫苗，具体地说是一种鳃弧菌油乳化二价口服疫苗及其制备。具体为疫苗由油相和水相组成，水相为 Tween-80，其加入甲醛灭活的利斯顿氏菌属 *Listonella MacDonellet Collwell* 的利斯顿氏菌 *Vibrioanguillarum* O1 血清型两种亚型菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC No. 1870 和 CGMCC No. 1871) 的菌悬液；油相为：Span-80、硬脂酸铝和运动黏度 7-13 的白矿油；其中水相和油相按体积比计为 1:1.5-2；水相中的菌悬液按体积百分比计：94%-98%。本发明采用鳃弧菌 O1 血清型两种亚型菌株制备的油乳化二价口服疫苗可以拓宽疫苗保护谱、增加疫苗的免疫协同作用，诱导水产养殖动物肠道的非特异性和特异性免疫应答，并提供保护效应。制备本发明的油乳化二价口服疫苗，所使用的材料成本低。

1. 一种鳃弧菌油乳化二价口服疫苗，其特征在于：疫苗由油相和水相组成，水相中加入利斯顿氏菌属 *Listonella MacDonellet Collwell* 的鳃利斯顿氏菌 *Vibrio anguillarum* 01 血清型两种亚型菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC No.1870 和 CGMCC No.1871）的菌悬液。

2. 根据权利要求 1 所述的鳃弧菌油乳化二价口服疫苗，其特征在于：所述水相为 Tween-80，按体积百分比计 94%-98% 的鳃利斯顿氏菌 01 血清型两种亚型菌株的菌悬液和 2%-6% 的 Tween-80；油相为：Span-80、硬脂酸铝和运动黏度 7-13 的白矿油；油相中各成份为：按体积百分比计 92%-96% 的运动黏度 7-13 的白矿油和 4%-8% 的 Span-80 和按油相总质量体积比的 1.5%-2.5% 的硬脂酸铝，其中水相和油相按体积比计为 1: 1.5-2，所述两种菌悬液浓度各为 $1-6 \times 10^9$ cells/ml。

3. 一种根据权利要求 1 所述的鳃弧菌油乳化二价口服疫苗的制备方法，其特征在于：

1) 制备乳化疫苗的水相：将 Tween-80 加入到复壮培养培养后并甲醛灭活的利斯顿氏菌属 *Listonella MacDonellet Collwell* 的鳃利斯顿氏菌 *Vibrio anguillarum* 01 血清型两种亚型菌株 CGMCC No.1870 和 CGMCC No.1871 的菌液中，搅拌混匀，得到乳化疫苗的水相；其中菌悬液占水相体积比的 94%-98%，Tween-80 占水相体积比的 2%-6%；

2) 制备乳化疫苗的油相：按体积百分比计取 92%-96% 的运动黏度 7-13 的白矿油、4%-8% 的 Span-80 和按总油相质量体积比 1.5%-2.5% 的硬脂酸铝，将其混合，加热使硬脂酸铝溶化，即得到乳化疫苗的油相；

3) 制备乳化疫苗：1 倍体积的水相缓慢加入到 1.5-2 倍体积油相中，以 1000—1500 rpm 的转速进行磁力搅拌 10-20 分钟，即得到油包水性乳化二价疫苗。

4. 根据权利要求 3 所述的鳃弧菌油乳化二价口服疫苗的制备方法，其特征在于：所述两种菌株复壮培养至浓度各为大于 10^9 cells/ml。

一种鳎弧菌油乳化二价口服疫苗及其制备

技术领域

本发明涉及鱼用疫苗，具体地说是一种鳎弧菌油乳化二价口服疫苗及其制备。

背景技术

目前水产养殖中常用的口服疫苗，是使用生物可降解物质（常用聚乙烯醇、丙烯酸树脂、海藻胶或脂质体）包被一种病原菌株的被膜或全细胞疫苗所制备，这种疫苗只针对病原菌的一种血清型对养殖动物起到保护作用，免疫保护谱窄，所使用的生物可降解材料成本高。

发明内容

本发明目的在于为了克服现有技术中口服免疫水产养殖动物中免疫保护谱窄、材料成本高的缺点，提供一种可针对不同血清型鳎利斯顿氏菌油乳化二价口服疫苗及其制备。

为实现上述目的，本发明采用的技术方案如下：

鳎利斯顿氏菌 01 血清型亚型菌株 CGMCC No.1870 (M3) 形态特征：

菌株在 2216E 培养基 24h 的菌落呈圆形、半透明，表面光滑、边缘整齐，直径约 1.5mm；在 TCBS 培养基的菌落呈黄色，直径约 3mm；革兰氏染色阴性，短杆状。可运动。有一根很长的极生单鞭毛和周生菌毛，菌体大小为 $0.8 \sim 1.0 \times 1.5 \sim 1.7 \mu\text{m}$ 。

M3 菌株氧化酶反应阳性，对弧菌抑制剂 0/129 (2, 4-二氨基-6, 7-二异丙基喋啶磷酸盐, 150ug / mL) 敏感，发酵葡萄糖不产酸，不产色素

鳎利斯顿氏菌 01 血清型亚型菌株 CGMCC No.1871 (SMP1) 形态特征：

菌株在 2216E 培养基 24 hr 的菌落呈圆形、半透明、表面光滑、边缘整齐。在 TCBS 培养基上不生长。革兰氏染色阴性，弯杆状，可运动，有一根很长的极生单鞭毛。

SMP1 菌株氧化酶反应阳性，对弧菌抑制剂 0/129 (2, 4-二氨基-6, 7-二异丙基喋啶磷酸盐, 150 ug/ml) 敏感，发酵葡萄糖产酸不产气，不产色素，脲酶阴性，根据这些特征并结合形态特征，可判定 SMP1 为弧菌科弧菌属细菌。

生理生化测试的特征参见表 1，

鉴定项目	SMP1	M3
甲基红	-	+
V. P	+	-
吲哚	-	-
0/129 敏感性	+	+
明胶液化	+	+
水解酪素	-	-
Tween 80 水解	+	+

卵磷脂酶	-	+
H ₂ S 产生	-	-
由阿拉伯糖产酸	+	-
由甘糖产酸	+	+
由蔗糖产酸	+	+
由甘醇产酸	+	+
由肌醇产酸	-	-
水解淀粉	+	+
生长不需加 NaCl	+	-
7 % NaCl 中生长	+	-
10 % NaCl 中生长	+	-
5℃ 生长	-	-
37℃ 生长	+	-
42℃ 生长	-	-
精氨酸 - 碱反应	+	+
赖氨酸脱羧酶	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-
溶血作用	+	+
发光	-	-
致病性	+	+

+：阳性，-：阴性。

疫苗由油相和水相组成，水相中加入利斯顿氏菌属 *Listonella MacDonellet Collwell* 的鳃利斯顿氏菌 *Vibrio anguillarum* 01 血清型两种亚型菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC No.1870 和 CGMCC No.1871）的菌悬液。

所述水相为 Tween-80，按体积百分比计 94%-98% 的鳃利斯顿氏菌 01 血清型两种亚型菌株的菌悬液和 2%-6% 的 Tween-80；油相为：Span-80、硬脂酸铝和运动黏度 7-13 的白矿油；油相中各成份为：按体积百分比计 92%-96% 的运动黏度 7-13 的白矿油和 4%-8% 的 Span-80 和按油相总质量体积比的 1.5%-2.5% 的硬脂酸铝，其中水相和油相按体积比计为 1: 1.5-2，所述两种菌悬液浓度各为 $1-6 \times 10^9$ cells/ml。

疫苗的制备方法：

1) 制备乳化疫苗的水相：将 Tween-80 加入到复壮培养培养后并甲醛灭活的利斯顿氏菌属 *Listonella MacDonellet Collwell* 的鳃利斯顿氏菌 *Vibrio anguillarum* 01 血清型两种亚型菌株 CGMCC No.1870 和 CGMCC No.1871 的菌液中，搅拌混匀，得到乳化疫苗的水相；其中菌悬液占水相体积比的 94%-98%，Tween-80 占水相体积比的 2%-6%；

2) 制备乳化疫苗的油相：按体积百分比计取 92%-96% 的运动黏度 7-13 的白矿油、4%-8% 的 Span-80 和按总油相质量体积比 1.5%-2.5% 的硬脂酸铝，将

其混合,加热使硬脂酸铝溶化,即得到乳化疫苗的油相;

3)制备乳化疫苗:1倍体积的水相缓慢加入到1.5-2倍体积油相中,以1000—1500 rpm的转速进行磁力搅拌10-20分钟,即得到油包水性乳化二价疫苗。

所述两种菌株复壮培养至浓度各为大于 10^9 cells/ml。

本发明所具有优点如下:

1. 本发明采用鳃利斯顿氏菌 01 血清型两种亚型菌株制备的油乳化二价口服疫苗可以拓宽疫苗保护谱、增加疫苗的免疫协同作用,诱导水产养殖动物肠道的非特异性和特异性免疫应答,并提供保护效应。

2. 制备本发明的油乳化二价口服疫苗,所使用的材料成本低。

附图说明

图 1 为本发明鳃利斯顿氏菌 M3 菌株的形态图。

图 2 为本发明鳃利斯顿氏菌 SMP1 菌株的形态图。

图 3 为使用本发明疫苗免疫后大菱鲆后肠溶菌酶活力变化情况图。

图 4 为使用本发明疫苗免疫后大菱鲆后肠抗蛋白酶活力变化情况图。

图 5 为使用本发明疫苗免疫后大菱鲆后肠抗鳃利斯顿氏菌 M3 抗体效价变化情况图。

图 6 为使用本发明疫苗免疫后大菱鲆后肠抗鳃利斯顿氏菌 SMP1 抗体效价变化情况图。

图 7 为使用本发明疫苗免疫大菱鲆后鳃利斯顿氏菌 M3 感染大菱鲆死亡情况图。

图 8 为使用本发明疫苗免疫大菱鲆后鳃利斯顿氏菌 SMP1 感染大菱鲆死亡情况图。

图 9 为使用本发明疫苗免疫大菱鲆后在大菱鲆后肠切片上检测到的抗体图。

图 10 为使用未乳化疫苗免疫大菱鲆后在大菱鲆后肠切片上检测的抗体图。

图 11 为不使用本发明疫苗的大菱鲆后肠组织切片图。

利斯顿氏菌属 *Listonella MacDonellet Collwell* 的鳃利斯顿氏菌 *Vibrio anguillarum* 01 血清型亚型菌株 M3 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 No.1870。

利斯顿氏菌属 *Listonella MacDonellet Collwell* 的鳃利斯顿氏菌 *Vibrio anguillarum* 01 血清型亚型菌株 SMP1 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 No.1871。

具体实施方式

下面根据附图说明和实施例对本发明作进一步说明。

实施例 1

利斯顿氏菌属 *Listonella MacDonellet Collwell* 的鳃利斯顿氏菌 *Vibrio anguillarum* 01 血清型亚型菌株 M3 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 No.1870。

利斯顿氏菌属 *Listonella MacDonellet Collwell* 的鳃利斯顿氏菌 *Vibrio anguillarum* 01 血清型亚型菌株 SMP1 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会

普通微生物中心 No.1871。

菌株 M3 形态特征:

菌株在 2216E 培养基 24h 的菌落呈圆形、半透明, 表面光滑、边缘整齐, 直径约 1.5mm; 在 TCBS 培养基的菌落呈黄色, 直径约 3mm; 革兰氏染色阴性, 短杆状。可运动。有一根很长的极生单鞭毛和周生菌毛, 菌体大小为 $0.8 \sim 1.0 \times 1.5 \sim 1.7 \mu\text{m}$ (见图 1)。

菌株 M3 反应阳性, 对弧菌抑制剂 0/129 (2, 4-二氨基-6, 7-二异丙基喋啶磷酸盐, 150ug / mL) 敏感, 发酵葡萄糖不产酸, 不产色素

菌株 SMP1 形态特征:

菌株在 2216E 培养基 24 hr 的菌落呈圆形、半透明、表面光滑、边缘整齐。在 TCBS 培养基上不生长。革兰氏染色阴性, 弯杆状, 可运动, 有一根很长的极生单鞭毛 (见图 2)。

菌株 SMP1 氧化酶反应阳性, 对弧菌抑制剂 0/129 (2, 4-二氨基-6, 7-二异丙基喋啶磷酸盐, 150 ug/ml) 敏感, 发酵葡萄糖产酸不产气, 不产色素, 脲酶阴性, 根据这些特征并结合形态特征, 可判定菌株 SMP1 为弧菌科弧菌属细菌。

将鳗利斯顿氏菌 01 血清型两种亚型菌株 M3 和 SMP1 进行复壮: 将 M3 与 SMP1 分别接液体试管, 28℃ 摇床过夜, 用 pH7.4 的 PBS 离心洗涤菌液, 至菌体浓度为 10^8 cells/ml , 分别腹腔注射大菱鲆, 取注射后死亡的大菱鲆解剖, 内脏划平板取样, 得到复壮的两株细菌; 挑取复壮后两种亚型菌株 M3 和 SMP1 单菌落分别接种至含 1.5% NaCl 的胰大豆蛋白胨肉汤培养基中, 28℃ 200 转/分钟摇床培养 24-48 小时后, 加入终浓度为 0.3% 甲醛室温灭活 48 小时, 而后 5000 转/分钟离心 10 分钟, 用 pH7.4 的缓冲溶液 PBS 洗涤, 共进行 3 次洗涤使悬菌体中两菌株浓度分别为 10^9 cells/ml 。胰大豆蛋白胨肉汤培养基成分: 18g TSB, 9g NaCl, 600ml 蒸馏水, 调 pH 至 7.4, 117℃ 高压灭菌 35 分钟。

1) 制备乳化疫苗的水相: 将 Tween-80 加入到复壮培养培养后的浓度分别为 10^9 cells/ml 甲醛灭活的鳗利斯顿氏菌 01 血清型两种亚型菌株菌液中, 搅拌均匀, 得到乳化疫苗的水相; 其中菌悬液按体积百分比 96% 取 19.2ml, Tween-80 按体积百分比 4% 取 0.8 ml。

2) 制备乳化疫苗的油相: 按体积百分比 94% 取 28.2 ml 10 号白油, 按体积百分比 6% 取 1.8 ml Span-80, 按油相总质量体积比 2% 取 0.6 g 硬脂酸铝, 将其混合, 加热使硬脂酸铝完全溶化, 121℃ 高压灭菌 25 分钟, 制备成乳化疫苗的油相。

3) 制备乳化疫苗: 按体积百分比 1:1.5 计取 20 ml 水相缓慢加入到 30 ml 油相中, 以 1000 rpm 的转速进行磁力搅拌 10 分钟, 即得到形成乳白色油包水性乳化二价疫苗。

实施例 2

与实施例 1 不同之处在于:

1) 制备乳化疫苗的水相: 将复壮培养培养后甲醛灭活的浓度分别为 $4 \times 10^9 \text{ cells/ml}$ 的鳗利斯顿氏菌 01 血清型两种亚型菌株菌液加入到 Tween-80 中,

搅拌混匀，得到乳化疫苗的水相；其中菌悬液按体积百分比 94%取 18.8ml，Tween-80 按体积百分比 6%取 1.2 ml。

2)制备乳化疫苗的油相：制备乳化疫苗的油相：按体积百分比 92%取 27.6ml 10 号白油，按体积百分比 8%取 2.4 ml Span-80，按油相总质量体积比 1.5%取 0.45 g 硬脂酸铝，将其混合，加热使硬脂酸铝完全溶化，灭菌制备成乳化疫苗的油相；

3)制备乳化疫苗：按体积百分比 1:2 计取 20 ml 水相缓慢加入到 40 ml 油相中，以 1000 rpm 的转速进行磁力搅拌 10 分钟，即得到形成乳白色油包水性乳化二价疫苗。

实施例 3

与实施例 1 不同之处在于：

1)制备乳化疫苗的水相：将复壮培养培养后甲醛灭活的浓度分别为 6×10^9 cells/ml 的鳃利斯顿氏菌 01 血清型两种亚型菌株菌液加入到 Tween-80 中，搅拌混匀，得到乳化疫苗的水相；其中菌悬液按体积百分比 98%取 19.6ml，Tween-80 按体积百分比 2%取 0.4 ml。

2)制备乳化疫苗的油相：按体积百分比 92%取 28.8ml 10 号白油，按体积百分比 4%取 1.2 ml Span-80，按油相总质量体积比 2.5%取 0.75 g 硬脂酸铝，将其混合，加热使硬脂酸铝完全溶化，灭菌制备成乳化疫苗的油相；

3)制备乳化疫苗：按体积百分比 1:1.8 计取 20 ml 水相缓慢加入到 36 ml 油相中，以 1000 rpm 的转速进行磁力搅拌 10 分钟，即得到形成乳白色油包水性乳化二价疫苗。

应用例 1

将 50 ml 实施例 1 制备的乳化疫苗加入到 300 g 鱼粉中，使用搅拌机充分搅拌混匀，制备分别包埋有乳化疫苗和未乳化疫苗的饵料。饵料置于 50℃烘箱中，烘烤 6-10 个小时至干燥，得到鱼饵料。鱼饵料中细菌细胞含量为 10^9 cells/g 饵料。将暂养大菱鲆随机分为两组，分别投喂含乳化疫苗、未乳化疫苗和未加疫苗的饵料。每天按 0.75g/尾分上下午投喂 2 遍，投喂 2 天即为免疫一次，每隔两周免疫一次，共免疫 3 次。免疫后检测大菱鲆后肠非特异性与针对两种抗原的特异性免疫应答反应。参见图 3、图 4、图 5、图 6。

应用例 2

将鳃利斯顿氏菌油乳化二价口服疫苗与含等量细菌抗原的未乳化疫苗分别与自制饵料混匀、成型、干燥，制成乳化和未乳化的鳃利斯顿氏菌二价口服疫苗，细菌细胞含量为 10^9 cells/g 饵料。将暂养大菱鲆随机分为三组，分别投喂含乳化疫苗、未乳化疫苗和未加疫苗的饵料。每天按 0.75g/尾分上下午投喂 2 次，连续投喂 7 天。并在免疫后 30 天取免疫组和对照组大菱鲆各 20 尾，分别以菌株 M3 和 SMP1 进行浸泡攻毒感染实验，各组死亡情况如图 7 和图 8，取后肠组织制作组织切片，通过原位杂交检测抗体。参见图 9、图 10、图 11。

乳化疫苗组对菌株 M3 和 SMP1 感染的免疫保护力分别为 100%和 50%，未乳化免疫组对菌株 M3 和 SMP1 感染的免疫保护力分别为 57.9%和 0%。



图 1

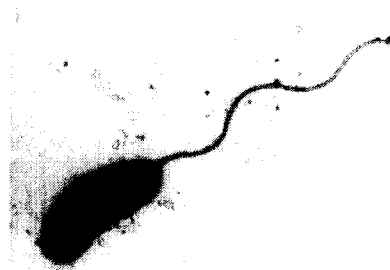


图 2

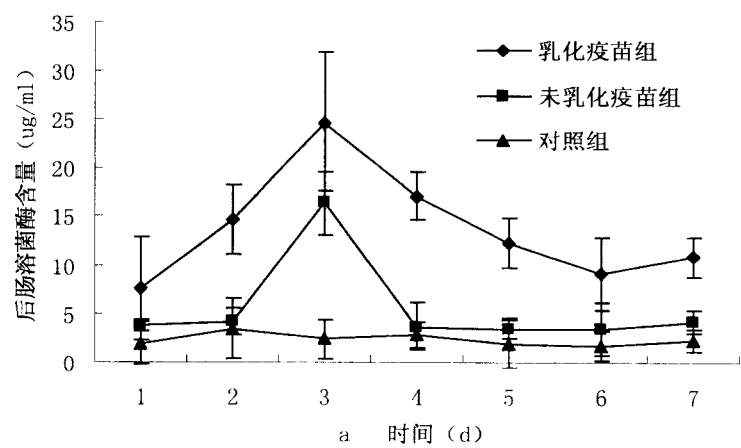


图 3

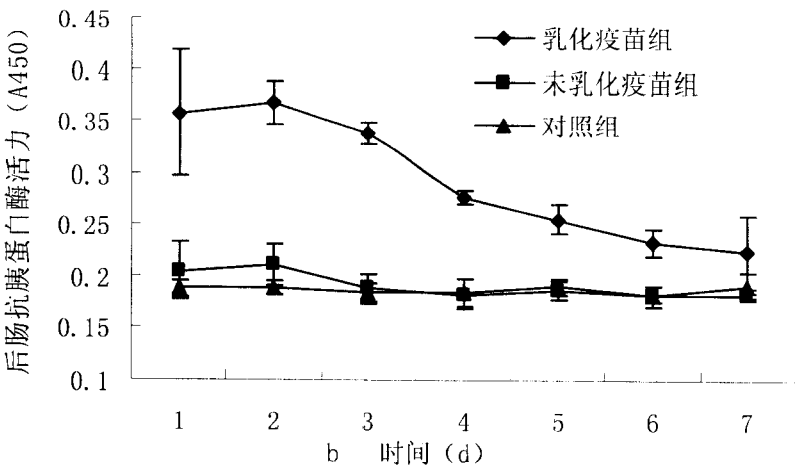


图 4

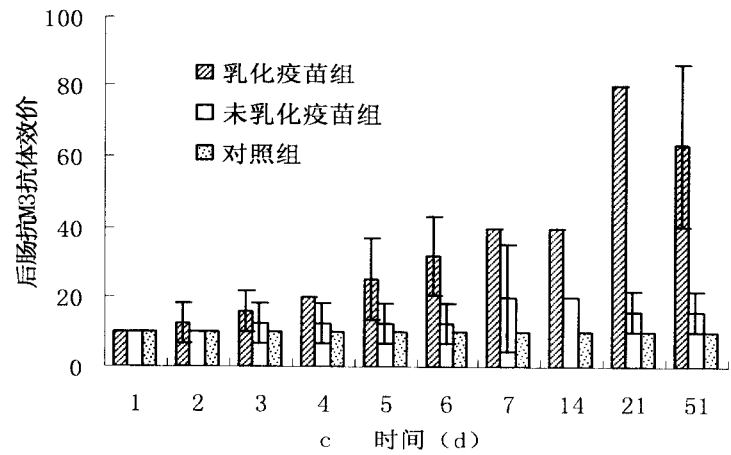


图 5

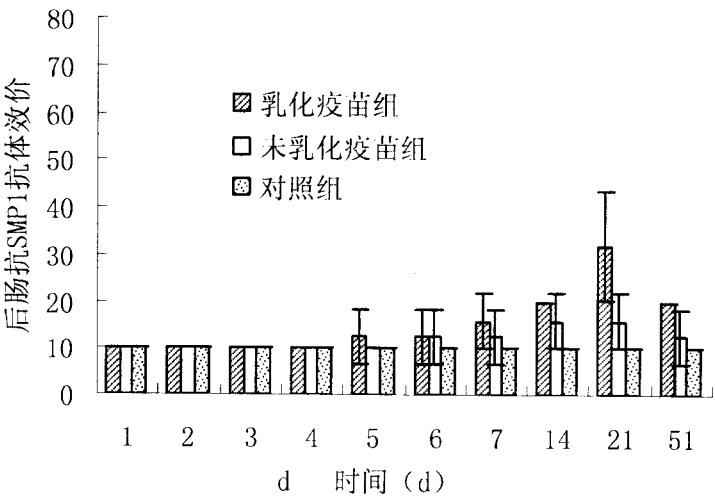


图 6

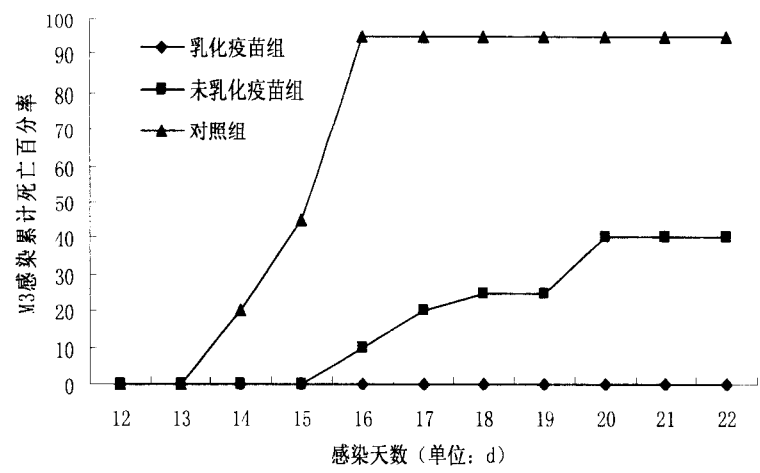


图 7

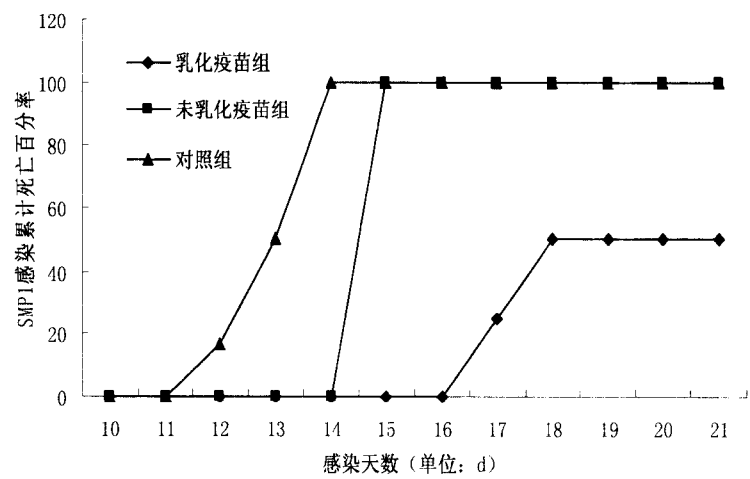


图 8

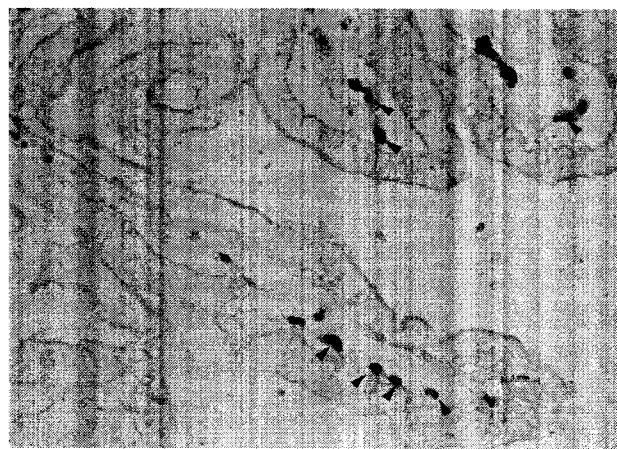


图 9

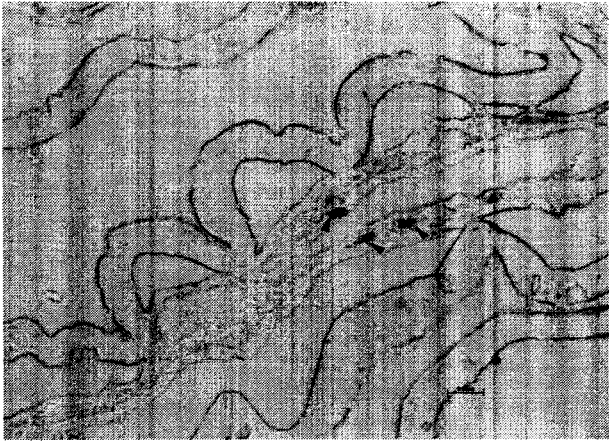


图 10



图 11