

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 21/00

C12N 1/20

A61K 39/108

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 90107108.0

[45] 授权公告日 2001 年 2 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1062605C

[22] 申请日 1990.8.18 [24] 颁证日 2000.11.25
[21] 申请号 90107108.0
[30] 优先权
[32] 1989.8.18 [33] NL [31] 89202110.6
[73] 专利权人 阿克佐公司
地址 荷兰阿恩海姆
[72] 发明人 约翰·富朗西斯科·凡·单·博石
[56] 参考文献
JOURNAL OF BACTEIOLOGY VOL. 168 NO. 3 1986.
12. 1 G KUWAJIMA 等
审查员 贾书瑾

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所
代理人 李 瑛

权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 大肠杆菌疫苗的制备方法

[57] 摘要

本发明发现一种新颖 E·Coli 毒素或一种免疫原片段,该毒素或片段能用于制备温血动物,尤其是鸟类的疫苗。所说毒素存在于粘附在细菌上的鞭毛结构中,这些鞭毛或游离毒素在失活后,能用于免疫动物,使之免受 E·Co li 感染。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

1. 保护个体免受大肠杆菌感染的疫苗的制备方法, 其特征在
于将大肠杆菌的鞭毛与药物上可接受的载体混合。

2. 根据权利要求 1 的疫苗的制备方法, 其特征在在于使用对
vero 细胞具有毒害活性的鞭毛。

3. 对温血动物中的大肠杆菌感染具有免疫活性的毒素的制备
方法, 其特征在在于培养可表达毒素的细胞, 所说的毒素

- a) 由一条单一多肽链组成;
- b) 用 SDS - PAGE 测得的分子量为 30 - 100kD;
- c) 可见于丝状集合体和/或与之有关;
- d) 天然状态下不具有结合的糖残基;
- e) 对 vero 细胞和对一日龄小鸡具有毒性;
- f) 在 100℃ 加热 1 小时仍保持其毒性,

此后分离该毒素或其片段。

4. 根据权利要求 3 的毒素的制备方法, 其特征在在于该毒素可
通过下列方法从属于血清型 H10 的大肠杆菌菌株中得到:

- a. 在胰蛋白酶大豆肉汤中培养所说的细菌;
- b. 用截断值为 30kD 的滤器浓缩所得培养物的不含细胞上清
液;
- c. 用 20mmol/升 Tris - HCl 缓冲液冲洗此滤器上面的物质;
- d. 将上述洗过的物质在一个 Sepharose (R) 4B 柱子上分离;
- e. 收集高分子量级分;
- f. 对上述级分进行 SDS - PAGE.

5. 根据权利要求 3 或 4 的毒素的制备方法，其特征在于细胞表达 SDS - PAGE 测得的分子量约为 47kD，等电点值约为 4.8 和部分氨基末端的氨基酸序列为 Ala - Gln - Val - Ile - Asn - Thr - Asn - Ser - Leu - Leu - (?) - Thr - Gln 的毒素。

6. 保护个体免受大肠杆菌感染的疫苗的制备方法，其特征在于将根据权利要求 3 - 5 制备的毒素与药物上可接受的载体混合。

7. 保护个体免受大肠杆菌感染的疫苗的制备方法，其特征在于将能够表达一个编码根据权利要求 3 - 5 制备的毒素的 DNA 序列的转化的微生物与药物上可接受的载体混合。

8. 根据权利要求 3 - 5 的制备毒素的方法，其特征在于利用如超过滤，离心和/或分子筛色谱法除去上清液中低分子量成分，而纯化出与 CH7 菌株毒素的抗体具有反应性的大肠杆菌的不含细胞的级分，通过它与所说抗体的反应性选出含有毒素的级分。

大肠杆菌疫苗的制备方法

本发明涉及一种保护个体免受大肠杆菌 (E. Coli) 感染的疫苗, 在该疫苗中使用的一种毒素以及该毒素纯化的方法。

大肠杆菌 (E. Coli) 是一种普遍存在的细菌, 它们群集于大多数动物的消化道。通常, 这种菌的繁殖不会产生严重的反作用, 在大多数情况下, 该细菌起着对寄主有利的作用。但是, 大肠杆菌 (E. Coli) 偶尔也引起严重的疾病, 尤其是在年幼动物。这种情况在鸟类和商业上进行的家禽繁殖中也会出现。感染后引起传染病, 导致严重的弱质病或年幼鸟类的大批死亡。

自然, 已经尝试过用接种方法控制 E. Coli 感染家禽。为实现这个目的, 已用菌苗 (失活的大肠杆菌) 接种成年鸡 (Avian Disease 29 (4), 1108-17 (1985))。菌苗的缺点是伴随有严重副作用。再者, 菌苗接种后开始时产生抗脂多糖的抗体, 该抗体仅对 E. Coli O 血清型有特异性, 因而不能保护个体免受其它血清型的 E. Coli 的感染。

另外, 常使用以 E. Coli 菌的缴毛为基础的疫苗抵抗该菌的感染。但是, 这些疫苗仅产生有限的保护作用, 受保护的个体数不超过接种个体的 80%, 基于这个原因, 大肠杆菌疫苗常包含另外一种毒性因子成份: 失活的 E. Coli 毒素。

许多种类的 E. Coli 含有对菌体游动起作用的鞭毛。以前由

于没有认识到E·C·O·L·I的鞭毛可作为一种毒性因子，因而没有用于E·C·O·L·I疫苗中。

根据本发明，业已发现大肠杆菌鞭毛与对V·e·r·o细胞的极强毒性有关（这种相关性至今没有被认识），且这些鞭毛蛋白毒素是一个重要的毒性因子。

基于上述发现，已制备出源于E·C·O·L·I鞭毛的疫苗。根据本发明所述，可利用E·C·O·L·I的完整鞭毛，也可以是所说鞭毛的亚结构单位，如鞭毛蛋白或鞭毛蛋白片段或集合体，它们能保护接种个体免受E·C·O·L·I感染。

在用大量E·C·O·L·I菌株进行的实验中（这些菌株主要是从鸡也包括从其它动物和人体中分离到的），发现鞭毛与对V·e·r·o细胞的毒性有关。这种毒性能被该鞭毛的抗体中和。经进一步证明发现，用于研究的所有E·C·O·L·I菌株的鞭毛毒性可被一种菌株的鞭毛的单一抗血清所中和。

基于这一发现，期望能用来自于单一E·C·O·L·I菌株的鞭毛接种个体而使之免受所有具有鞭毛的E·C·O·L·I菌株的感染。

基于上述考虑，本发明所述的疫苗是以在E·C·O·L·I中发现的一类新毒素为基础的，其特征是它们具有蛋白质的性质，且存在于鞭毛中和/或与鞭毛相关联，由S·D·S-P·A·G·E测得的分子量在30～100KD之间，没有结合糖残基，对V·e·r·o细胞和一日龄小鸡有毒，在100℃加热1小时仍保持毒性。

兼有上述特性使这些新毒素和本领域内已知的E·C·O·L·I毒素相区别。

在大量 E · C o l i 菌株中存在有上述的毒素，由于该毒素明显地存在于鞭毛结构中，本文将此命名为鞭毛毒素 (F T)。一般情况，这些鞭毛比正常纤毛 (典型纤毛直径为 7 n m，最长长度为 1 μ m) 大得多，最大可达 25 n m 粗，7 μ m 长。

根据实施例 1 概述的步骤，本发明所述的毒素种类之一是从小鸡 E · C o l i C H 7 (O 15 : K 14 : H 10) 菌株中分离到的。分离出的 C H 7 - F T 以几种形式存在，可以是 H 10 型的天然鞭毛，或是游离毒素，或由游离的毒素重新结合成的针状细丝。除前面介绍的一般特性外，C H 7 - F T 的典型特性是由 S D S - P A G E 测得的亚单位的分子量约 47 K D，等电点 P H 值约为 4.8，N H₂ - 末端的部分氨基酸序列：A l a - G l n - V a l - I l e - A s n - T h r - A s n - S e r - L e u - S e r - L e u - (?) - T h r - G l n。 (C H 7 - F T 的特性见实施例 2 的描述)。

抗 C H 7 - F T 的抗血清与用于试验的所有其它 E · C o l i 菌株的 F T 发生交叉反应 (见实施例 3)，因此，C H 7 - F T 的抗血清能用于对本发明所述的所有其它 F T 进行定性。再者，制备的单克隆抗体或者是特异性的或者与试验用的所有其它 E · C o l i 菌株的 F T 发生交叉反应。

本发明也包括具抗 E · C o l i 感染的免疫活性的疫苗，该疫苗的活性成分是一种本发明所述的失活的毒素。

该疫苗适当地含有所说的毒性鞭毛。通过在有利于鞭毛形成的条件下培养 E C o l i 细菌，从细菌中分离出鞭毛或不含细胞的上清液可很

容易地获得这种鞭毛。然后利用超过滤和／或分子筛色谱法除去上清液中低分子量成分进一步纯化 FT。

在纯化过程中，利用 FT 与 CH 7 - FT 的单克隆抗体的反应性监测富含 FT 的部分。

本发明所述疫苗还包括能保护接种个体免受 E · Coli 感染的 FT 的一个片段。

根据本发明，疫苗中掺入的 FT 可通过化学合成，从 E · Coli 细胞培养物中纯化或通过重组 DNA 技术得到。

在后一种情况，例如可通过用诱导出的抗 FT 的多克隆或单克隆抗体进行特异性反应，筛选 E · Coli 基因组 DNA 文库中含有所说核酸序列的各个克隆而识别出编码上述蛋白质或其片段的核酸序列。将该核酸序列连接到能进行各种表达的 DNA 序列上，产生一个能转化到合适寄主的所谓的重组核酸分子。这样的杂交 DNA 分子来自于，例如：质粒、噬菌体或病毒核酸序列。寄主细胞可以是原核细胞，如细菌，也可以是真核细胞如哺乳动物细胞。转化后的寄主细胞能产生 FT，分离该蛋白质，随后将它掺入本发明的疫苗中。

在另一个实施例中，制备的一种活载体疫苗，含有非病原性微生物，如：含有编码 FT 基因的病毒或细菌。

除了 FT，本发明疫苗还可含有一种水介质或一种水悬液和／或如：为提高活性和／或延长活性成分寿命而加入的其它成分。这些成分可以是盐，以及使 FT 毒性失活而保持免疫特性的试剂（如：福尔马林），PH 缓冲液，乳化剂和增强免疫应答的佐剂（如矿物油，胞壁酰双肽，氢氧化铝，皂苷、聚阴离子和两亲物质）。

本发明疫苗用于免疫温血动物〔包括人〕，免受E·Coli感染，尤其是用于鸟类抗E·Coli感染。

为达到上述目的，优选方法是将该疫苗通过非肠胃方法施用于个体，如通过皮下或肌肉。以这种方式施用疫苗，使接种后的鸟类获得主动免疫，对下蛋的鸟类接种后，可使后代获得被动免疫能力。对

下蛋鸟类免疫后，它的体内产生的抗体理所当然地引入到鸟蛋蛋黄中，随后，进入孵化出的小鸟中。

疫苗组成和接种系统可根据需要保护的动物类型、动物的年龄和体重，需要保护的时期，用药方式，以及期望产生主动免疫或借助母体的抗体产生被动免疫这些情况而变化。用于家禽非肠胃接种时，疫苗活性成分的最适有效量大约是10-100 μ g/剂量。本发明疫苗也可以和其他适当的疫苗结合使用。

实施例 I

E·Coli GH7 菌株鞭毛毒素的分离

A. 鞭毛毒素的制备

E·Coli GH7 (O15:K14:H10) 菌株在装有12升含有14% PO₂ 的胰蛋白酶豆汤 (B. B. L) 的 Biostat E 发酵器 (Braun) 中以100-500 rpm 变速搅拌培养一夜，在带有HVLP滤器的Pellicon滤器系统 (Millipore) 中将培养物浓缩至约1升，将细菌以10,000 rpm (GSA转头, Sorvall) 离心30分钟，得到的上清液通过0.45 μ m 滤器过滤后，加到HVLP滤液中。

将滤液浓缩至大约1升并利用PTTK滤器，用1升0.2 mol/升 Tris HCl 缓冲液洗浓缩物3次。

将大约 110 - 160 ml 的部分 P T T K 浓缩物通过高度为 100 cm, 面积为 154 cm² (Amicon model P140 × 250), 用含有 0.1% Na N₃ 作为保存剂, PH = 7.2 的 50 mmol / 升磷酸缓冲液 (PB) 平衡过的 Sepharose 4 B - G1 柱 (Pharmacia, Uppsala Sweden) 后, 反复洗脱。柱子用 PB 洗脱至记录仪上的基线为零。

收集含有高分子量分子的第一峰的洗脱物, 然后在 YM - 100 超过滤器 (Ø 62 mm Amicon, With Amicon UF model 202) 上浓缩到蛋白质浓度约为 2 - 3 mg / ml, 浓缩物在含有 0.1% Na N₃ 作为保存剂的 5 升 20 mmol / 升 PH 7.5 的 Tris · HCl 缓冲液中透析两次。

B: 游离毒素的制备

利用 Laemmli 的方法 (Nature 227, 680 - 4; 1970) 将浓缩物进行制备电泳。将浓缩物在含有 20 ml 甘油, 20 ml Tris - HCl 缓冲液 (0.5 mol / l, PH 6.8), 20 ml 10% SDS, 5 ml 2 - 巯基乙醇 (ME) 和 2 ml 0.05% 溴酚蓝的样品缓冲液中以 1 : 1.67 稀释。

然后, 在水中将样品煮沸 5 分钟, 冷却, 在 16 × 0.6 cm 的 12% (Ac r : b i s = 30 : 0.8) 制备聚丙烯酰胺平板胶上电泳。典型的样品负载量大约是 15 - 23 mg 蛋白质 / 胶 (7.5 ml 浓缩物和 5.0 ml 样品缓冲液)。在 Protean 细胞模型 1423 (Bio - Rad, Richmond USA) 或模型 SE 600 (Hoef er, San Francisco, USA) 上进行电泳。当前沿物

质从凝胶中走出后，继续在220V进行电泳1小时。从胶上切下宽约1.5-2mm的薄片。

在室温下用10ml 0.89% NaCl溶液+0.1% NaN₃浸提蛋白质3小时，在4℃连续搅拌过夜。取出薄片，将溶液通过一个0.45μm的滤器过滤。收集含有纯毒素亚单位的部分，贮存于-20℃。

用改良Folin-Giocalteu分析方法【J. Biol. Chem. 73, 627; 1927】，测定样品中蛋白质含量，根据Dubois利用的苯酚硫酸酯分析方法【Anal. Chem. 28, 350-6, 1956】测定多糖量。

实施例2

E. Coli CH7菌株的毒素的特性

A. 对一日龄小鸡的致死率

第一个实验是用0.2-0.5ml各种E. coli毒素制剂给一日龄SPF的小鸡【GVP, Doorn】进行腹膜内注射。第二个实验，将0.5ml毒素制剂静脉内注射到3周龄小鸡体内。注射后7天记录死亡数。

结果

如表1所示，来自于鸡E. Coli菌株CH₂和CH7的毒素制剂通过腹膜内注射后能使一日龄小鸡死亡。对于CH7菌株，不论是它的上清液或胞溶物都有毒，而对于CH2菌株，胞溶物尤其有毒性。

表 1

一日龄小鸡的致死率：腹膜注射 E. coli 菌株的上清液或胞溶物

注射的制剂 *	剂 量 (ml)	死亡数 / 总鸡数, 注射后天数		
		1	4	7
无菌 T S B	0.5			1/10
Z F 2 4 上清液	0.2			1/10
上清液	0.5			1/10
溶胞物	0.2			1/10
溶胞物	0.5			1/10
C H 2 上清液	0.2		1/10	1/10
上清液	0.5		1/10	1/10
溶胞物	0.2	9/10	9/10	9/10
溶胞物	0.5	6/10	7/10	8/10
C H 7 上清液	0.2	2/10	4/10	5/10
上清液	0.5	4/10	5/10	5/10
溶胞物	0.2	4/10	4/10	4/10
溶胞物	0.5	7/10	7/10	7/10

* 菌株 C H 2 和 C H 7 是从鸡中分离出的 E. coli 菌株;
 菌株 Z F 2 4 是来自人类的无毒 E. coli 分离株。
 用同样试剂静脉注射 3 周龄小鸡完全没有作用 (数据未列出)。

B. Vero 试验

在5% CO₂ 气体和补充有5%胎牛血清(FCS)和200 μ l /ml 青霉素和200 μ g /ml 链霉素, 过滤除菌后再补充2 μ g /ml 两性霉素B的基质6 (每升含有85 ml MEM Eagle, 100 ml 胰蛋白酶磷酸盐肉汤, 50 ml 4.4% NaHCO₃) 中37℃培养Vero细胞, 胰蛋白酶作用后, 以在每孔中加入200 μ l 含有 2×10^5 个细胞/升的完全培养基6, 而将细胞接种于96孔的平底聚苯乙烯培养平板(Greiner)。培养一夜后形成单层细胞。移走培养基, 加入200 μ l /孔不含FCS但补充了10 μ g /ml 黄嘌呤(3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤, Sigma)的培养基6。随后, 每孔中加入20 μ l 系列稀释毒素制剂。培养5天后记录细胞病理学作用(CPE)。

筛选产毒菌株的试验, 首先在每孔中加入20 μ l 未稀释或稀释了1:2的上清液。其次, 对于在Vero试验中上清液显示阴性的菌株, 将该菌株的50 μ l 未稀释或1:2稀释的溶菌物加入每孔中, 测定这些菌株产生的细胞内毒素。

结果:

首先将列于表2的菌株进行产毒试验。其中一些菌株分泌毒素于上清液中, 其他菌株产生细胞内毒素和/或具有用超声波破碎细胞后才能检测到的毒素。对Vero细胞的细胞病理学影响的测定值是近似的, 且有不同程度的波动。但在大多数情况下, 细胞单层仍保持完整。

表 2

不同E. Coli菌株对Vero细胞的毒性

菌株*	血清型	毒素效价**, 存在于	
		上清液	溶胞物
JA221	-	-	-
EF24	O23:K?:H-	-	-
CH1	O78:K80	-	-
CH2	O78:K80:H4	-	8
CH3	O45:K-:H9	32	64
CH4	O 2:K1:H-	-	8
CH5	C 2:K1:H5	32	512
CH6	O1:K1:H-	-	4
CH7	O15:K14:H10	128	1,024
CH8	O115:K?	-	16
CH13	O35:K-	32	

* JA221是一个E. Coli K-12菌株; ZF24见表1; CH菌株是鸡中分离出的菌株。

** 毒素效价定义为: 具毒性作用的最后稀释度的倒数值。

C. 毒素的稳定性

通过测定毒素制剂对各种处理的敏感度，对已识别的毒素进行初步定性。pH 敏感度试验是将毒素 pH 值调至 3—10，在室温下培养一夜后中和，然后进行毒性试验。

对热敏感性试验，是将毒素制剂在各种温度下加热进行的。

SDS 和 ME 对毒素的影响的测定是分别在 1% SDS 和 1% SDS + 2.5% ME 存在时加热毒素，然后在盐水中透析。对 ureum（尿素）敏感性的试验，是将 6 M ureum 加入到毒素制剂中 1 小时后，在盐水中透析。

对福尔马林的敏感度试验是将不同浓度的福尔马林加到毒素制剂中，在不同温度培养一夜，透析，用 Vero 细胞分析试验进行毒性测定。胰蛋白酶敏感度试验是加入 100 μ g/ml 胰蛋白酶（来自牛胰，Millypore），在 37°C 培养 4 小时，然后加入 150 μ g/ml 胰蛋白酶抑制剂（黄豆，Sigma）在 37°C 抑制 30 分钟，再进行毒性试验。

结果：

在对 Vero 细胞的毒性试验中，由于不同龄的 Vero 细胞的状况不同，不能重复地测得精确的鸡毒素效价。这里列出的结果仅证明典型实验的情况。

将 CH5 和 CH7 的上清液 pH 值调至 3 到 10（包括 10）时毒性不受影响，毒素效价是不变的值分别是 32—64 和 128—256。

对热敏感性和对 SDS 或 SDS+ME 处理的敏感性显示在表 3 中。

表 3

在没有和有 SDS 或 SDS+ME 存在时加热毒素制剂, 对鸡 E. Coli 毒素效价的影响

处 理	C H 2 胞溶物	C H 5 上清液	C H 7 上清液
对 照	8	32	128
8 0 °C (1 小时)	4	8	64
1 0 0 °C (1 小时)	4	8	16
1 2 0 °C (2 0 分钟)	0	0	0
6 5 °C (1 0 分钟)		16	64
S D S , 6 5 °C (1 0 分钟)		32	64
S D S + M E , 6 5 °C (1 0 分钟)		32	64
1 0 0 °C (1 0 分钟)		8	64
S D S , 1 0 0 °C (1 0 分钟)		32	128
S D S + M E , 1 0 0 °C (1 0 分钟)		16	128

在长时间置于较高温度下，C H 2胞溶物 (L y s) 和 C H 5 以及 C H 7 上清液 (S u p) 的毒性稍有下降，在 1 2 0 °C 加热后，毒性完全消失，但仍认为该毒素具相对热稳定性。在 S D S 或 S D S + M E 存在时，加热 1 0 分钟对 C H 5 和 C H 7 上清液的毒性没有影响。

用 6 M u r e u m 处理后 C H 2 胞溶物和 C H 5 、 C H 7 上清液对各个的 V T 效价丝毫没有影响。

如表 4 所示，在室温和 3 7 °C 时加入福尔马林能使 C H 7 上清液毒性消失。

用胰蛋白酶处理后，C H 5 和 C H 7 上清液毒性完全消失，假处理和单独用胰蛋白酶抑制剂处理后，对毒性没有丝毫影响。

表 4

用不同浓度的福尔马林与 C H 7 上清液培养一夜，上清液中毒性消失情况

福尔马林浓度 (%)	在下面温度培养后的毒素效价	
	室 温	37℃
0	64	64
0.2	32	16
0.5	16	4
1.0	8	2
2.0	1	0

D: 分子量测定

利用 Laemmli 的方法在 12% 凝胶 (Acr: Bis 30: 0.8) 进行分析凝胶电泳后, 与标准分子量相比, 决定 CH7 菌株毒素的分子量。

用考马斯亮兰 (CBB) 染色凝胶, 利用凝胶扫描器 CS-930 型和 DR-2 记录仪 (Shimadzu, Kyoto Japan) 进行扫描。

图 1 表示, 载有分子量标记物的凝胶电泳后, 用考马斯亮兰染色后的扫描图。与 1-6 个峰相应的标准分子量分别是 78000, 66000, 45000, 30000, 17200 和 12300 dal (LKB1860-12 Bromma, Sweden)。

图 2 和图 3 分别表示从实施例 1 的步骤 A 和步骤 B 得到的产品的扫描图。

在这些实验中测得的 E. coli CH7 菌株的毒素亚单位的分子量约为 47 KD。

E. 等电点测定

毒素等电点的测定是将从实施例 1 步骤 A 得到的 3 ml E. coli CH7 菌株毒素与 pH 3-7 的 0.5 ml Servalytes (分析纯级, Heideberg Germany) 和 46.5 ml 水的混合物在 12 W 振动 5 小时 (Rotor, Bio-Rad Richmond USA) 进行等电聚焦。分析凝胶电泳结果测定毒素含量。

该实验结果概括于表 5 中

从实验结果可知，E · C o l i C H 7 菌株的毒素的等电点 p H 值为 4 · 8 。

结果：

表 5

3 ml Sephadex B-4 样品聚焦后的 PH 值和毒素效价

管号	PH	毒素*	管号	PH	毒素*
1	2.68	+	11	5.50	-
2	3.26	++	12	5.82	-
3	3.50	-	13	6.23	-
4	3.73	-	14	6.57	-
5	4.18	-	15	6.85	-
6	4.38	+-	16	7.14	-
7	4.55	++	17	7.47	-
8	4.80	++++	18	7.97	-
9	5.09	++	19	8.41	-
10	5.32	+	20	8.75	-

* = 无可见毒素 ± = 刚能看到 + = 能看到

++ , ++ , +++ , ++++ = 毒素量逐渐提高

F. 糖含量

从实施例 1 步骤 B 得到的 E·Coli CH7 菌株的毒素既不含多糖也没有用 Dubois 等的苯酚硫酸酯分析 (Analytical Chemistry 28, 350-356; 1956) 测得的糖存在。在 Limulus Amoebocyte (鲎变形细胞) 溶解物试验 (Pyrotell, MA, USA) 中没有检测到有效的 LPS (内毒素) 活性。

G: 氨基酸分析

利用 Chang 的液相 DABITC 方法 (Methods Enzymology 91, 455-466; 1983) 测定 N-末端氨基酸序列。利用薄层层析法识别 DABTH-氨基酸。用 Janssen 等人描述的 PTC 技术 (Chromatographia 22, 345-358; 1986) 测定氨基酸组成, 假定亚单位分子量为 47 KD 的 CH7-FT 相对应的氨基酸总数为 446 个。

结果:

从实施例 1 步骤 A 和步骤 B 得到的 E·Coli CH7 菌株的毒素的 N 末端氨基酸序列如下:

Ala-Gln-Val-Ile-Asn-Thr-Asn-
Ser-Leu-Ser-Leu-(?)-Thr-Gln

该序列与 Kuwajima 等 (Journal of Bacteriology 168, 1479-1483; 1986) 描述的 E·Coli K-12 鞭毛蛋白的 N 末端氨基酸序列相同。

表6显示毒素的氨基酸组成,也表示与E·Coli K-12
鞭毛蛋白具有很大程度的同源性。

表 6

CH 7 - FT 氨基酸组成的测定和与 E. Coli K-12
鞭毛蛋白的氨基酸组成的比较：每个亚单位的氨基酸数目(%)

氨基酸	CH 7 - FT ¹	E. Coli K-12鞭毛蛋白 ²
Ala	50(11.2)	59(11.9)
Arg	12(2.7)	11(2.2)
Asn	} 52(11.7)	48(17.5)
Asp		39
Cys	4(0.9)	0(0)
Gln	} 43(9.6)	27
Glu		14 (6.2)
Gly	37(8.3)	44(8.9)
His	0(0)	0(0)
Ile	24(5.4)	28(5.6)
Leu	32(7.2)	37(7.4)
Lys	28(6.3)	25(5.0)
Met	2(0.4)	3(0.6)
Phe	9(2.0)	5(1.0)
Pro	8(1.7)	6(1.2)
Ser	58(13.0)	43(8.7)
Thr	48(10.8)	65(13.1)
Trp	0(0)	0(0)
Tyr	11(2.5)	10(2.0)
Val	28(6.3)	33(6.6)
总计	446	497

¹ PTC方法测定 (Chromatographia 22, 345-358; 1986)

² DNA序列分析法测定 (Journal of Bacteriology 168
1479-1483; 1986)

实施例 3

筛选 F T 表达型鸡 E · C o l i 菌株和 F T 血清学特征

检测来自于世界各地的总计为 1 2 4 个鸡 E · C o l i 分离菌的毒性、游动性和细菌表面 F T 抗原的表达，用多克隆和单克隆抗体显现 F T 且研究交叉反应。

方法:

毒性试验和毒素中和作用

如实施例 2 B 描述的方法，测定各菌株对 V e r o 细胞的毒性。中和作用试验，是将毒素制剂与稀释后的抗血清在 3 7 °C 一起培养 2 小时，然后进行毒性试验。

游动性试验:

在含有低琼脂浓度 (0 · 2 5 %) 的营养肉汤的 U 形试管中测定菌株的游动性。在这些 U 形管一端接种一个 E · C o l i 菌株，3 7 °C 培养一夜后，记录菌株向试管另一端的迁移情况。

抗血清的制备

根据实施例 1 A 描述的方法，在兔和鸡中制备抗 E · C o l i C H 7 菌株的 F T 的抗血清。用按实施例 1 B 中描述的方法 制得的 C H 5 和 C H 7 菌株毒素生产单克隆抗体 (M O A b) 。在制备 M O A b 时，将来自于免疫鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合，用 E L I S A 方法，从得到的杂交瘤中分离出抗毒素抗体分泌物。将克隆后的杂交瘤由腹膜内注射到鼠体，取出腹水液，在 5 6 °C 加热 1 0 分钟使腹水失活后，用 1, 1, 2 - 三 氯 三 氟乙烷 (M e r c k) 萃取脂类，用 5 0 % 饱和度的硫酸铵沉淀 M O A b s 。

E · C o l i 菌株的 F T 抗原表达

在室温下用无毒 *E. coli* RDEC-1 (O15:K14) 菌株吸附 CH7 菌株 (O15:K14:H10) FT 的兔抗血清 24 小时, 根据下面进行的完整细菌 ELISA 方法, 用这些吸附的抗血清筛选表达 FT 的菌株。

将细菌在 TSB 中不搅拌培养 6 小时, 然后 3000 rpm 离心 15 分钟 (Sorvall RT6000) 再悬浮于 CBB 缓冲液 ($1.59 \text{ g/l Na}_2\text{CO}_3$, 2.93 g/l NaHCO_3 ; 0.2 g/l NaN_3 , pH 9.6), 达到在 660 nm 处 OD 值为 0.140—0.180。将该细菌悬液以每孔 100 μl 的浓度接种于平底聚苯乙烯微滴平板, 在 50°C 干燥一夜。用自来水冲洗平板, 在室温下, 在每孔中加入 100 μl PBS-T-N (0.04 M PBS ; pH 7.2; 0.5% Tween 80; 15% 新生牛的血清) 阻遏 1 小时。随后, 每孔中加入 100 μl 系列稀释的吸附过的血清 (在 PBS-T-N 中稀释, 起始稀释度为 1:100), 每个菌株设置加入 PBS-T-N 的 2 个孔作为空白对照。37°C 培养 1 小时后, 洗涤平板, 每孔中加入 100 μl 在 PBS-T-N 中适当稀释的过氧化物酶结合的羊抗兔 IgG (H+L), 37°C 培养 30 分钟后, 再次洗涤平板。所结合的抗体通过在每孔中加入 100 μl 含有脲过氧化氢 (Ureum Peroxide) (Organon Teknika, Oss) 和溶于 NaAc-柠檬酸缓冲液 (pH 5.5) 的 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺的 TMB 底物缓冲液, 然后用比色法测定。在黑暗中放置 10 分钟进行显色反应, 加入 50 μl 4 N H_2SO_4 中止反应, 用 Microelisa 读数器在 450 nm 处测定, 测得的最高稀

释度为抗血清的效价，此时 A 4 5 0 值至少是空白 A 4 5 0 的 2 倍。

在每一个试验中，CH 7 和 R D E C - 1 菌株分别作为阳性和阴性对照。

W e s t e r n 吸印试验

基本上按照 M u i l l e r m a n 等 (A n a l . B i o c h e m . 1 2 0 , 4 6 - 5 1 ; 1 9 8 2) 描述的方法，进行免疫吸印和 W e s t e r n 吸印试验。将细菌在胰蛋白酶豆汤中搅拌培养 6 小时，制备菌体的 F T 粗制品。在充分混合后，离心移走菌体，通过乙醇测定法将上清液浓缩约 4 0 倍 (1 份上清液 + 2 份 9 6 % 乙醇，4 °C 培养过夜，离心后，将沉淀溶于 0 . 0 4 m o l / 升 P B S , P H 7 . 2) ，得到的 F T 粗制品进行 S D S - P A G E ，转吸到硝酸纤维素滤膜上，通过与抗体，过氧化物酶结合的适当种类的抗 I g G (H + L) 以及脲过氧化氢和 3 , 3 ' - 二氨基联苯胺 · 4 H C l 一起连续培养后，检测抗原。

I m m u n o g o l d - 电子显微术 (I G - E N)

基本上按照 A l p h e n 等 (I n f e c t . I m m u n . 5 6 , 1 8 0 0 - 6 ; 1 9 8 8) 描述的方法进行 I G - E M 试验，简单地说，在胰蛋白酶豆汤中生长的细菌与在 P B S + 1 % B S A + 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (P B S - B - T) 稀释的抗体一起培养，用 P B S 洗三次，然后与用金颗粒标记的蛋白质 A 一起在 P B S - B - T 中培养，用 P B S 再洗三次后，将细菌转移到聚乙烯醇缩甲醛树脂包裹的网格中，用 1 % 乙酸双氧铀或磷钨酸进行负染色。

结果：

从世界各地收集的 1 2 4 个鸡 E . C o l i 菌株中，7 3 个菌株

(占59%)能分泌对Vero细胞有毒性的可检测量的毒素活性成分。另有37个菌株(占30%)在细菌细胞溶解后对Vero细胞有毒。在完整细菌ELISA试验中,52个菌株(占42%)与CH7-FT的抗血清反应,在ELISA试验中显示阳性的所有菌株也产生胞外Vero毒素(表7)。

表 7

对 V e r o 细胞毒性与对 C H 7 - F T 抗血清反应性之间的关系 (菌株数)

		V e r o 毒性 ²	
		+	-
抗 C H 7 - F T 反应活性 ¹	+	5 2	0
	-	2 1	5 1

¹ 在完整细菌 E L I S A 试验中与 C H 7 - F T 抗血清的反应

² 细菌培养物上清液对 V e r o 细胞的毒性。

在 V e r o 毒素的分泌和菌株游动性之间具强烈相关性 (见表 8)。

表 8

Ver o 毒性和游动性之间相关性 (菌株数)

		V e r o 毒性 ²	
		+	-
游动性 ¹	+	69	10
	-	4	41

¹ 在U形管中的游动性

² 细菌培养物上清液对V e r o细胞的毒性。

上述结果进一步证明V e r o毒性存在于鞭毛中，也发现细菌经过U形管迁移后提高了V e r o毒性。上述结果也表明不同菌株的毒素具血清学交叉反应。

进一步研究不同菌株毒素的交叉反应。表9中显示菌株C H 7的F T兔和鸡抗血清能中和试验的所有其它有毒菌株的V e r o毒性。抗菌株C H 5和C H 7 F T的M O A b s丝毫不中和该毒性。

表 9

CH7-F T 抗血清对培养上清液中 Vero 毒性的中和作用

菌株	血清型	Vero 毒素效价 ¹		
		对照 ²	KO7577 ³ (1:10)	BB1-2 ⁴ (1:10)
CH3	045:K-H9	8	-	-
CH5	02:K1:H5	16	-	-
CH7	015:K14:H10	32	-	-
CH125	01:K1:H7	32	4	-
CH135	02:K1:H4	54	4	-

¹ 见表 2。

² 假处理样品上清液，或用原免疫血清处理。

³ 兔抗 CH7-F T 抗血清；稀释 1:10。

⁴ 鸡抗 CH7-F T 抗血清，稀释 1:10。

表 10

来源于不同菌株的 F T 粗制品与抗血清的 Western 吸印试验, 以及与相应鞭毛蛋白分子量的比较

菌株	血清型	抗体 ¹				鞭毛蛋白分子量
		KO7577	BB1-2	α H10	Int1-7	Int12-13
CH3	045:K-H9	70 ²	70	70	-	70
CH5	02:KL:H5	43	43	43	-	43
CH7	015:KL4:H10	47	47	47	47	47
CH125	01:KL:H7	60	60	60	-	60
CH135	02:KL:H4	35	35	35	-	35

¹ KO7577 = CH7-F T 的兔抗血清;

BB1-2 = CH7-F T 的鸡抗血清;

α H10 = H10 型鞭毛的凝集抗血清; 从 R I V M (B i l t h o V e n) 购买;

I n t 1-7 = CH7-F T 单克隆抗体;

I n t 12-13 = CH5-F T 的单克隆抗体。

² 数据表示在吸印试验中出现的单一谱带或主谱带的近似表观分子量 K D 值。

³ A. M. L a w n (J. G e n. M i c r o b i o l. 101, 112-130; 1977).

⁴ 本发明测定的作为参照的 H10 型鞭毛菌株的鞭毛蛋白分子量。

表10显示FT粗制品与不同抗血清的Western吸印试验结果。CH7-FT的兔和鸡抗血清（分别是K07577和BB1-2）与所有试验中其余FT制剂反应，虽然这些菌株的谱带分子量不同。利用抗H10鞭毛凝集抗血清能得到同样结果。CH5-FT的MOAb Int12-13在Western吸印反应中也显示相同型式。CH7-FT的MOAb Int1-7仅与47KD的CH7-FT谱带反应。显然，与各种具H型鞭毛菌株相应的鞭毛蛋白的分子量几乎与各自的FTs的表观分子量相一致。许多带H10型鞭毛的菌株，来自于RIVM（Bilthoven），在用多克隆抗血清进行的Western吸印试验中显示有45KD或47KD的谱带。MOAb Int1-7仅与H10型鞭毛菌株的47KD谱带反应。当将菌株先经过U形管迁移，再制备的FT粗制品，用于Western吸印试验中能提高出现的谱带强度。

在IG-EM试验中，利用CH7-FT的多克隆抗血清，将CH5和CH7菌株的类鞭毛丝状体用金颗粒标记。用CH7-FT的MOAb Int1-7进行的同样试验中，只有CH7菌株的类鞭毛丝状体能用金颗粒标记，而不能标记CH5菌株的此类鞭毛。利用实施例1B描述的制备SDS-PAGE制备CH5-FT的MOAb Int12-13进行IG-EM试验时，不能有效地标记类鞭毛丝状体，仅在CH5和CH7菌株细胞表面能观察到这样的金颗粒。事实上，MOAb Int12-13仅与离解的FT反应（Western吸印试验，ELISA）而不与完整FT反应（IG-EM，ELISA）。

所有这些结果表明Vero毒性存在于鞭毛中，或者FT与鞭毛

完全相同。再者，不同菌株的 F T s 具有血清学上的高度交叉反应性和交叉中和作用。

实施例 4

通过被动免疫对小鸡的保护作用

用按实施例 1 A 描述的方法制得的 CH7—F T 接种小鸡制备 CH7—F T 的抗血清。收集来自于不同鸡的抗血清，在 56 °C 加热 10 分钟使之失活。

用 1 ml 上述 CH7—F T 抗血清静脉注射三周龄小鸡 (Euribrid, Boxmeer, The Netherlands)。在抗血清注入小鸡后 1 小时内，将 0.2 ml 细菌悬液注射入右后胸气囊中使鸡感染。细菌在血琼脂基质平板 (Oxoid) 上培养一夜后，悬浮于 PBS 中，稀释至适当的浓度。实验所用的 E. Coli 菌株全是从患有大肠杆菌病的鸡的感染心脏中分离到的。用同样剂量的细菌感染作为对照的鸡，该对照用的鸡没有施用抗血清或仅注射阴性对照血清，在鸡中注入抗原激发 (免疫应答) 后，将它们安置于有一般食物和水的减压隔离器中。接种后 7 天，记录死亡率。

如表 1.1 所示，由 CH7—F T 抗血清给鸡带来的被动免疫作用能有效地保护鸡免受由 5 个试验的 E. Coli 菌株中的 3 个菌株进行的免疫激发。三个菌株对鸡的感染由于抗血清的有效保护作用而受阻，该三个菌株中的 2 个菌株在培养上清液中分泌毒性，一个菌株对 Vero 细胞的毒性仅在于细菌溶胞物中，也可看到二个菌株对鸡的感染不能被抗血清有效地保护，这两菌株的毒性都只存在于细菌溶胞物中。显然，抗血清仅对游动菌株的感染能提供有效保护。

表 11
用 CH7-F T 抗血清产生的被动免疫保护小鸡免受 E. Coli 感染

感染用菌株				施 用 C H 7 - F T 抗血清	死亡率 ³ (在总数中 死亡数)	P < 0.05 ⁴
菌株号	血清型	毒素 ¹	游动性 ²			
CH2	078:K80:H4	lys	+	+	7/16	+
CH2	078:K80:H4	lys	+	-	14/16	
CH5	02:K1:H5	Sup	+	+	3/16	+
CH5	02:K1:H5	Sup	+	-	6/9	
CH6	01:K1:H-	lys	-	+	15/33	-
CH6	01:K1:H-	lys	-	-	21/36	
CH7	015:K14:H10	Sup	+	+	3/32	+
CH7	015:K14:H10	Sup	+	-	18/29	
CH2/45	035:K-H-	lys	-	+	6/17	-
CH2/45	035:K-H-	lys	-	-	7/19	

¹ 单一培养上清液 (Sup) 或单一细菌溶菌物 (lys) 对 Veroto 细胞的毒性;

² 菌株在 U 形管中的游动性;

³ 感染后 7 天在鸡总数中死亡的鸡数。

⁴ 对抗血清产生的有效保护作用的 X² 测验。

说明书附图

图. 1

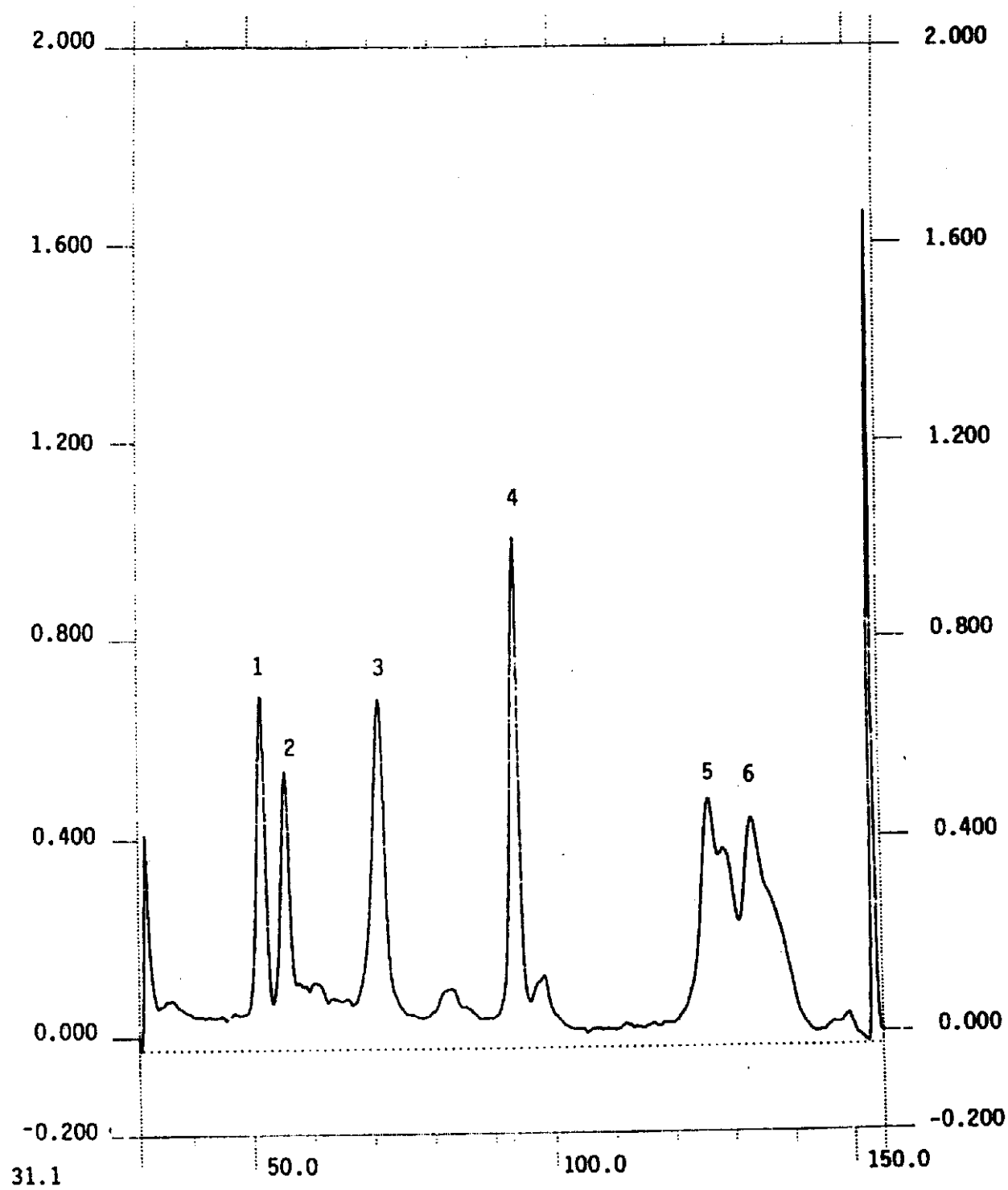


图 2

