

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200710051389.2

[51] Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年2月11日

[11] 授权公告号 CN 100460503C

[22] 申请日 2007.1.26

[21] 申请号 200710051389.2

[73] 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

[72] 发明人 贝为成 陈焕春 林丽雯 刘金林
周锐 金梅林 何启盖 方六荣
吴斌 肖少波 郭爱珍 曹胜波

[56] 参考文献

CN1713921A 2005.12.28

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 *apx II/Amp^r* 突变株的构建. 贝为成等. 畜牧兽医学报, 第35卷第2期. 2004

审查员 潘俊宇

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋

权利要求书1页 说明书14页 附图4页

[54] 发明名称

一种不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清1型双基因缺失突变株的疫苗及应用

[57] 摘要

本发明属于动物细菌基因工程技术领域, 具体涉及一种不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清1型双基因缺失突变菌株的构建、疫苗制备及应用。本发明得到一株不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清1型双基因缺失突变菌株 *Actinobacillus pleuropneumoniae* APP-1-mut01 (保藏号为 CCTCC NO; M207005)。该菌株缺失了猪胸膜肺炎放线杆菌血清1型两个主要毒力基因激活因子 *apxIC* 和 *apxIIC*, 产生没有毒力的毒素蛋白 *ApxIA* 和 *ApxI-IA*, 但这两个毒素蛋白仍然具有免疫原性。本发明还公开了利用该双基因缺失菌株制备猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗及其应用。本发明制备的双基因缺失疫苗可以刺激猪产生抵抗猪胸膜肺炎放线杆菌同源和异源血清型野毒株的保护性免疫反应, 有

效防止猪胸膜肺炎放线杆菌的感染。

1、一种不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型的双基因缺失突变菌株,其特征在于该菌株是猪胸膜肺炎放线杆菌 *Actinobacillus pleuropneumoniae* APP-1-mut01, 其保藏号为 CCTCC NO: M207005。

3、包含权利要求 1 所述的一种不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型的双基因缺失突变菌株的疫苗。

3、权利要求 1 所述的猪胸膜肺炎放线杆菌 APP-1-mut01 在制备猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗中的应用。

一种不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株的疫苗及应用

技术领域

本发明属于动物细菌基因工程技术领域，具体涉及一种不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株的构建、疫苗制备及应用

背景技术

猪传染性胸膜肺炎（porcine contagious pleuropneumonia, PCP）是由胸膜肺炎放线杆菌（*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP）引起的一种猪传染性呼吸道疾病，给世界养猪业造成了严重的经济损失。自我国发现 PCP 流行以来，广大兽医工作者对其病原学、流行病学、诊断及防制等方面都进行了一系列研究，取得了一定的成就。但目前该病在我国发病率仍逐年增长，有的猪场阳性率已达到 70% 以上，已经成为集约化猪场的主要传染病之一，严重危及到我国的养猪业。

胸膜肺炎放线杆菌，属于巴氏杆菌科（*Pasteurellaceae*）、放线杆菌属（*Actinobacillus*），是一种革兰氏阴性小球杆菌，有荚膜和菌毛，不形成芽孢，能产生毒素，最近研究发现该菌还有鞭毛。根据 APP 生长对烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD，又称 V 因子）的依赖性，把 APP 分为生物 I 型和生物 II 型两个生物型。生物 II 型菌株的生长依赖 NAD，而生物 I 型菌株的生长不依赖 NAD，但需要其它特定嘌呤或嘌呤前产物以辅助生长（Nielsen R, Andresen L O, Plambeck T, Nielsen J P, Krarup L T, Jorsal S E. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Vet Microbiol*, 1997, 54(1): 35-46）。

胸膜肺炎放线杆菌主要抗原是荚膜多糖、脂多糖、外膜蛋白、溶血素、粘附素等抗原（王春来等，2001）。根据细菌荚膜（capsule, CP）和脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）抗原的不同，人们最初将 APP 生物 I 型分离菌株鉴定为 15 个血清型。各地方流行的血清型有所差异，不同血清型之间的交叉保护不强。我国主要流行血清 1、2、3 和 7 型，所有血清型均具有强弱不同的溶血活性与细胞毒性。同时，APP 的是一种多毒力因子病原，其毒力因子很多。现已发现与 APP 的致病性有关的毒力因子包括荚膜多糖（CP）、脂多糖（LPS）、外膜蛋白（OMP）、转铁结合蛋白（TBP）、溶血外毒素（Apx）、蛋白酶、渗透因子、黏附因子、菌毛、尿素酶以及细菌对转铁蛋白携带铁的利用能力等。

目前在 APP 中已发现 4 种不同的 Apx 具有溶血活性或细胞毒性，即 ApxI、ApxII、ApxIII 和 ApxIV（Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, Nicolet J, Anderson T J, MacInnes J I, Seger R P A M, Frey J. Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999, 8 (Pt 8): 2105-2116)。如果要产生和分泌具有生物活性的 Apx 毒素，需要相邻的按一定顺序排列的四个基因 CABD 组成的操纵子调控，其中

A基因编码毒素结构蛋白，C基因编码毒素激活蛋白，负责对毒素进行酰基化激活，B基因和D基因的翻译后蛋白产物形成跨膜通道，负责毒素由细胞内到细胞外的分泌。ApxI、ApxIII操纵子有完整的CABD基因，而ApxII操纵子只有C基因和A基因，其产物由ApxI的BD基因产物负责分泌到细胞外。

大量试验已证实，这些毒力因子大部分都是 APP 重要的保护性抗原。其中 APP 产生的溶血外毒素 (Apx) 被认为既是 APP 最重要的一个毒力因子 (Tascon R I, Vazquez Boland J A, Gutierrez Martin C B, Rodriguez Barbosa I, Rodriguez Ferri EF. The RTX haemolysins ApxI and Apx II are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol Microbiol*, 1994, 14 (2): 207-216; Frey J, Beck M, van den Bosch J F, Segers R P, Nicolet J. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Mol Cell Probes*, 1995, 9 (4): 277-282)。研究发现，不分泌或缺失了 Apx 的 APP 菌株对猪和小鼠均不致病，但缺失突变菌株在补充 Apx 的结构基因和分泌基因后又可恢复原来的毒力 (Tascon R I, Vazquez Boland J A, Gutierrez Martin C B, Rodriguez Barbosa I, Rodriguez Ferri EF. The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol Microbiol*, 1994, 14 (2): 207-216; Reimer D, Frey J, Jansen R, Veit H P, Inzana T J. Molecular investigation of the role of ApxI and Apx II in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Microb Pathog*, 1995, 18 (3): 197-209)，而且 Apx 气管灌注可以直接引起 APP 的临床症状和肺部病变 (Kamp E M, Stockhofe-Zurwieden N, van Leengoed L A, Smits M A. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect Immun*, 1997, 65 (10): 4350-4354)。同时，无毒性的溶血外毒素 (Apx) 也是一种很重要的免疫保护性抗原。Prideaux 等 (1998) (Prideaux C T, Pierce L, Krywult J, Hodgson A L. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Curr Microbiol*, 1998, 37 (5) : 324-332 利用插入失活的方法把含有 *apxIA* 基因的一个表达质粒插入到已经分离到的一株天然缺失结构毒素 ApxIIA 和翻译后激活蛋白 ApxIIC 但仍保留分泌必须基因 *apxIB* 和 *apxID* 的 APP 血清 7 型 APP 突变菌株，构建了表达无活性 ApxI 蛋白的弱毒菌株，免疫小鼠后证实小鼠模型是致弱的且能诱导小鼠产生 Apx 特异性抗体，不仅能抵抗 APP 血清型 7 型的攻击，而且能对异源血清 1 型也产生了较好的保护力。与该突变菌株相比，不表达 ApxI 的亲本菌株对异血清 1 型没有保护力。这进一步证实了毒素在交叉保护中所起的重要作用，也为毒素弱毒菌株的构建提供了一个新的思路。然而，这种弱毒活疫苗疫苗的应用，由于含有保护性抗原的质粒在体内复制过程中容易丢失而受到限制。随后 Prideaux 等 (1999) (Prideaux C T, Lenghaus C, Krywult J, Hodgson A L. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the Apx II operon. *Infect Immun*, 1999, 67 (4): 1962-1966 通过使用位点特异性突变构建了 *apxIIC* 基因插入失活的基因工程突变菌株，但结构毒素 ApxIIA 和两个分泌必须基因 *apxIB*、*apxID* 仍然存在，这样细菌可以持续而安全地表达无活性的 ApxIIA 毒素。突变菌株经鼻腔内接种动物，不仅表现出毒力降低，而且能诱导动物产生针对不同血清型 APP 攻击的交叉保护，展示了 APP 基因缺失疫苗良好的应用前景。这也是首次报道 APP

弱毒菌株接种动物能够提供抗 APP 异源血清型很好的交叉保护。

目前商品化的全菌灭活疫苗和亚单位疫苗能够减轻同源血清型菌感染猪引起的临床症状并降低死亡率，但不能降低发病率、慢性感染和阻止肺部病变，对异源血清型菌的感染也不能提供完全的交叉保护。可以说，目前采用灭活苗和亚单位疫苗免疫不是最好的选择，迫切需要更安全、高效、廉价的新型疫苗来预防和控制该传染病的发生与流行。

与灭活疫苗和亚单位疫苗不同，自然感染或试验感染能够诱导抗任何异源血清型的保护。这样，弱毒活疫苗也许是解决当前商品化疫苗不足的一种可行方法。构建胸膜肺炎放线杆菌突变菌株的传统方法存在很多缺陷。如利用化学或转座子介导的突变方法存在随机性，只适合于表型发生明显变化突变子的筛选，而不导致明显表型变化的突变菌株就不能通过这些方法获得；而通过同源重组导致靶基因突变方法获得的突变菌株最后含有抗性标记，由于不符合生物安全性要求不能作为疫苗株用于疫苗生产。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术存在的缺陷，获得一种免疫原性更好和安全性更强的猪胸膜肺炎放线杆菌双基因缺失疫苗；

本发明的第二个目的是利用胸膜肺炎放线杆菌双基因缺失突变菌株制备猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗；

本发明的第三个目的是胸膜肺炎放线杆菌双基因缺失突变菌株在制备猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗中的应用。

本发明通过以下技术方案实现：

一种不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株-猪胸膜肺炎放线杆菌（分类命名：*Actinobacillus pleuropneumoniae*）APP-1-mut01，于 2007 年 1 月 19 日保藏在中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号：CCTCC NO: M207005。

所述的不含抗性标记猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株缺失胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型两个主要毒力基因激活因子 apxIC 和 apxIIC，缺失后产生没有毒力的毒素蛋白 ApxI 和 ApxII，但毒素蛋白仍具有很好免疫原性。

本发明的不含抗性标记猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株，其基因工程菌株衍生于本申请人申请日前已经公开报道的自行分离鉴定的猪胸膜肺炎放线杆菌（参见：王贵平等，猪胸膜肺炎放线杆菌快速 PCR 检测方法的建立，中国兽医学报，2004，24（2），129-131）。所述的重组猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株其主要毒力基因 apxIC 缺失了 500bp，apxIIC 缺失了 480bp，导致毒力大大降低，该细菌不再具有细胞毒性和溶血活性，因而具有很高的安全性。而且由于突变菌株仍然能表达无毒性的 ApxIA 和 ApxIIA 蛋白，因此具有很好的免疫保护力。

本发明的基本构建方法是：利用基因工程技术使猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型（简称 APP-1，下同）两个主要毒力因子的激活因子 apxIC 和 apxIIC 完全缺失后，因为要产生和分

泌具有生物活性的 Apx 毒素，需要相邻的按一定顺序排列的四个基因 CABD 组成的操纵子调控，其中 A 基因编码毒素结构蛋白，C 基因编码毒素激活蛋白，负责对毒素进行酰基化激活，B 基因和 D 基因的翻译后蛋白产物形成跨膜通道，负责毒素由细胞内到细胞外的分泌。ApxI、有完整的 CABD 基因，而 ApxII 操纵子只有 C 基因和 A 基因，其产物由 ApxI 的 BD 基因产物负责分泌到细胞外。因此，当毒力基因的激活因子 apxIC 和 apxIIC 完全缺失后就不会产生具有毒性的毒素蛋白，由于 A 基因是结构蛋白，与免疫保护性相关，表达的 ApxIA 和 ApxIIA 蛋白的生物学特性没有改变。通过大量的生物学实验数据证明本发明制备的双基因缺失菌株可用于制备猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗。

本发明的主要优点是：

1、本发明所用血清型菌株是目前我国流行并严重导致猪发病的优势血清型，毒力最强，同时免疫保护性也最好。因此，用该亲本菌构建的双基因缺失突变菌株制成疫苗对猪免疫具有很强的针对性，具有广阔的市场应用前景。

2、猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型两个主要毒力基因的激活因子 apxIC 和 apxIIC 完全缺失后基因缺失突变菌株毒力大大降低，但免疫原性未发生改变，可以保护同源和异源血清型菌攻击。

3、本发明猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株不含抗性标记，完全符合疫苗生物安全性要求。

附图说明

图 1：是本发明中用于构建不含抗性标记猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 双基因缺失突变菌株的物理图谱。

图 2：是本发明制备的转移质粒 pEM Δ IC 的鉴定结果。

图中 M:DNA marker (DL 15000) 1: pEM Δ IC/XbaI I+SmaI 2: pEM Δ IC/ XbaI

图 3：是本发明制备的转移质粒 pEM Δ IIC 的鉴定结果。

图中 M:DNA marker (DL 15000) 1: pEM Δ IIC/XbaI I+SmaI 2: pEM Δ IIC/ XbaI

图 4：是本发明制备的 pEM Δ IC 转移质粒构建的流程图。

图 5：是本发明的 pEM Δ IIC 转移质粒构建的流程图。

图 6：是本发明中不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株的 PCR 检测电泳图谱。

图 A：apxIC—双交换 PCR 鉴定图，图中 M：DL2000 DNA 分子量对照；77 号为筛选的缺失株；(+) 质粒阳性对照；(-) H₂O 阴性对照；

图 B：apxIIC—双交换 PCR 鉴定图，M：DL2000 DNA 分子量对照；7 号为筛选的双基因缺失株

图 7：是本发明中的不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株的 Western-blotting 分析结果。

图 A 是用 Western-blotting 方法 检测 ApxII

图中 1：亲本株；2：突变菌株

图 B 是用 Western-blotting 方法 检测 ApxI

图中 1: 亲本株; 2: 突变菌株

图 8: 是本发明中的不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株的溶血实验结果。

图中 A 区: 表示亲本菌株; B 区表示 apxIC 一单基因缺失株; C 区表示/apxIC、apxIIC 双基因缺失株

图 9: 是本发明中的不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株的生长特性实验结果。

图 10: 是本发明中的不含抗性标记的猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因缺失突变菌株的遗传稳定性实验结果。

具体实施方式

以下结合说明书附图对本发明作进一步的说明。

实施例 1

1、引物设计（用于基因克隆和分子检测）

根据已报道的 APP-1 株序列（参照 GenBank 登录号为 X68595 的基因序列）设计四对引物分别扩增毒素 apxI 激活基因 apxIC 上游臂和下游臂，扩增片段大小分别为 800bp 和 1700bp，上游臂两端分别设计 EcoRI 和 HindIII 酶切位点，下游臂两端分别设计 HindIII 和 XhoI 酶切位点；apxII 的激活基因 apxIIC 的上游臂和下游臂，扩增片段大小分别为 1600bp 和 1800bp，上游臂两端分别设计 PstI 和 EcoRI 酶切位点，下游臂两端分别设计 KpnI 和 XhoI 酶切位点。上述引物均由上海生物工程公司合成。引物序列如下：

pI-1: 5' -AGCGAATTCTTAAATTGCCTTTTACT-3' (EcoRI)
 pI-2: 5'-GCTAAGCTTTGATTACTCTCAATCGC-3' (HindIII) 上臂 800bp
 pI-3: 5' -GTACTCGAGCTAAGGAGACAACATG-3' (HindIII)
 pI-4: 5' -ACACTCGAGGTTTGCTTACGCTCACG-3 (XhoI)下臂 1700bp
 pII-1: 5' GCCTGCAGATTAAACAGCACCCCTAC-3'(PstI)
 pII-2: 5'-GTGAATTCGTAGCATCATCCCTCCC-3' (EcoRI)上臂 1600bp
 pII-3: 5'-TCCTCGAGGGCAATTAGAATCTATC-3'(EcoRI)
 pII-4: 5'-GCGGTACCTTCACCTGGAGTTAGT-3' (KpnI)下臂 1800bp

2. 猪胸膜肺炎放线杆菌毒素 apxI 激活基因 apxIC 上游臂和下游臂、apxII 的激活基因 apxIIC 的上游臂和下游臂的克隆

将改良的 TSA（即胰蛋白大豆琼脂培养基，购自美国 GIBCO 公司，以该培养基为基本成分，附加按体积比为 1%的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 10%的小牛血清）融化，冷却至 50℃，加适量烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD, 又称 V 因子，购自中国上海化学试剂公司），倒于平板中，待冷却凝固后，置 37℃温箱 2~3h 至水汽烘干。将冻干的 APP 血清 1 型和 7 型菌接至烘干平板中过夜培养。第二天挑取单菌落接种于改良 TSB（即胰蛋白大豆琼脂培养基，购自美国 GIBCO 公司，以该培养基为基本成分，附加按体积比为 1%的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 10%的小牛血清）培养基中，37℃ 200 r/min 培养 7-10h 提

取细菌的基因组。

取 1 mL 改良 TSB 培养基于 EP 管中，室温 8000 r/min 离心 5min，弃上清，沉淀悬浮于 1 mL TE 溶液中。加入 6 μ L 50mg/mL 的溶菌酶，37 $^{\circ}$ C 作用 2h 后加 2mol/L NaCl 50 μ L，10% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 110 μ L，20mg/mL 的蛋白酶 K 3 μ L，50 $^{\circ}$ C 作用 3h 或 37 $^{\circ}$ C 过夜。均分到两个 EP 管，加等体积的酚：氯仿：异戊醇 (100：99：1) 抽提两次，用 0.6V 的异丙醇沉淀 0.5h 以上，离心后再用 75% 的乙醇洗涤，凉干后，溶于 500 μ L ddH₂O 中作 PCR 模板。

扩增反应在 50 μ L 的体系中进行，反应体系如下：模板 DNA (1:100 质粒 DNA) 2 μ L，10 \times PCR 缓冲液 5 μ L，25mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L，10 μ mol/L P₁ 0.5 μ L，10 μ mol/L P₂ 0.5 μ L，1mmol/L dNTPs 2 μ L，TaqE 1 μ L，ddH₂O 33.4 μ L。

扩增条件为：95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后进入循环，循环参数为 94 $^{\circ}$ C 1 min，57 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 40 sec。35 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增的 PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析，扩增四个片段大小分别为 800bp、1700bp、1600bp 和 1800bp，与预期大小相当。将得到的目的基因克隆到 pMD-18 载体 (购自大连宝生物工程有限公司)，送大连宝生物工程有限公司进行外源基因序列的测定，参见图 1 所示。

3. pEM Δ IC 转移质粒的构建

用 EcoRI 和 HindIII 酶切大小为 800bp 的 apxIC 上游臂 PCR 扩增产物，用 HindIII 和 XhoI 酶切大小为 1700 bp 的 apxIC 下游臂 PCR 扩增产物，同时用 EcoRI 和 XhoI 酶切载体 pEMOC2。回收 apxIC 上游臂基因、apxIC 下游臂基因和载体 pEMOC2，然后用 T₄ DNA ligase 连接，16 $^{\circ}$ C 水浴过夜，转化 DH5 α 感受态细菌，37 $^{\circ}$ C 培养，挑菌，然后将连接产物转化 DH₅ α 大肠杆菌，小量制备质粒、酶切鉴定，从而获得转移质粒 pEM Δ IC。其物理图谱见图 1。鉴定结果证实构建的转移质粒 pEM Δ IC 正确的 (见图 2)，转移质粒 pEM Δ IC 构建流程如图 3 所示。

4. pEM Δ IIC 转移质粒的构建

用 PstI 和 EcoRI 酶切大小为 1600 bp 的 apxIIC 上游臂 PCR 扩增产物，用 KpnI 和 XhoI 酶切大小为 1800 bp 的 apxIIC 下游臂 PCR 扩增产物，同时用 PstI 和 XhoI 酶切载体 pEMOC2。回收上下游同源臂基因和载体 pEMOC2，然后用 T₄ DNA ligase 连接，16 $^{\circ}$ C 水浴过夜，转化 DH5 α 感受态细菌，37 $^{\circ}$ C 培养，挑菌，然后将连接产物转化 DH₅ α 大肠杆菌，小量制备质粒、酶切鉴定，从而获得转移质粒 pEM Δ IIC。其物理图谱见图 1。鉴定结果证实构建的转移质粒 pEM Δ IIC 正确的 (见图 4)，转移质粒 pEM Δ IIC 构建流程如图 5 所示。

5. apxIC 单基因缺失突变菌株 SJ01/apxIC⁻的构建

将构建的转移质粒 pEM Δ IC 转化进入大肠杆菌 Ecoli β 2155 (德国汉若威大学 Gerald-F. Gerlach professor 赠送) 中，然后将携带有转移质粒 pEM Δ IC 的大肠杆菌 (Ecoli β 2155) 与亲本菌 APP 血清 1 型 (APP-1) 进行转接，在氯霉素抗性平板 (将 25ug/mL 的氯霉素加入进温度为 50-60 $^{\circ}$ C 灭菌的 TSA 培养基中) 上筛选阳性菌落，将阳性单菌落在不含氯霉素抗性 TSB 培养基上培养增殖得到抗性菌落后，再在 5% 蔗糖平板上筛选耐蔗糖菌落，将经过筛选得到单基因缺失突变菌株命名为 SJ01/apxIC⁻。

提取单基因缺失突变菌株 SJ01/apxIC⁻ 基因组 DNA，用 PCR 扩增 apxIC 基因，以确定是否

能扩增出大小为 500 bp *apxIC* 特异性 DNA 片段。如果不能扩增出所述的 DNA 片段, 则表明结果与预期相符, 即可初步鉴定筛选的单基因缺失突变菌株是正确的, 如图 6A 所示。

6. *apxIC*、*apxIIC* 双基因缺失突变菌株 SJ01/*apxIC*⁻/*apxIIC*⁻ 的构建

将构建的重组质粒 pEM Δ IIC 转化至大肠杆菌 *E. coli* β 2155, 同时将以上构建的毒素 *apxIC* 单基因缺失突变菌株作为亲本菌, 将携带有重组质粒 pEM Δ IIC 大肠杆菌 *E. coli* β 2155 与亲本菌进行转接, 在氯霉素抗性平板 (将 25 μ g/mL 的氯霉素加入进温度为 50-60 $^{\circ}$ C 灭菌的 TSA 培养基中) 上筛选阳性菌落, 将阳性单菌落在不含氯霉素抗性 TSB (含 NAD 和血清) 培养增殖抗性菌落后, 在 5%蔗糖平板上筛选耐蔗糖菌落, 命名为 SJ01/*apxIC*⁻/*apxIIC*⁻。

提取双基因缺失突变菌株 SJ01/*apxIC*⁻/*apxIIC*⁻ 基因组 DNA, 用 PCR 扩增 *apxIIC* 基因, 看是否能扩增出大小为 480 bp *apxIIC* 特异性 DNA 片段。如果不能扩增出所述的 DNA 片段, 表明结果与预期相符, 可初步鉴定筛选的突变菌株是正确的, 如图 6B 所示。

7. *apxIC*、*apxIIC* 双基因缺失突变菌株 (SJ01/*apxIC*⁻/*apxIIC*⁻) 的生物学特性及其鉴定

(1) 双基因缺失突变菌株 (实验编号为: SJ01/*apxIC*⁻/*apxIIC*⁻) 免疫学活性分析

以突变菌株培养后的上清液和离心后的溶菌液为样品进行 SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳), 按此方法进行蛋白表达和聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶转移至硝酸纤维素膜, 用 0.5%牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 30 分钟后加入一抗 1 小时, 兔抗猪 IgG-HRP, 37 $^{\circ}$ C 1h 经 TBS 洗后 3, 3' 二氨基联苯二胺盐酸盐 (购自 Sigma 公司) 显色。结果如图 7 所示: 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型双基因 *apxIC*、*apxIIC* 失活后仍能分泌大小约 110kDa 具有良好免疫原性的毒素蛋白 *ApxIA*、*ApxIIA*。

(2) 双基因缺失突变菌株溶血活性分析

挑取双基因缺失突变菌株和亲本菌 APP-1 和 APP-7 型, 分别接种于含有绵羊血的血琼脂平皿 (按照常规方法), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 观察它们的溶血情况。结果如图 8。图 8 显示基因缺失突变菌株完全失去了溶血。

(3) 双基因缺失突变菌株生长特性分析

分别挑取亲本菌 (实验编号: SJ01)、单基因缺失突变菌株 (实验编号: SJ01/*apxIC*⁻) 和双基因缺失突变菌株 (实验编号: SJ01/*apxIC*⁻/*apxIIC*⁻) 单菌落, 接种入 TSB 培养基中培养, 每间隔 1 小时取样, 以分光光度计 OD₆₀₀ 读取其值, 通过每一个相同时间段 OD₆₀₀ 值大小来比较它们的生长快慢。结果如图 9 所示: *apxIC* 和 *apxIIC* 基因的缺失对 APP 的生长没有影响。

(4) 双基因缺失突变菌株的遗传稳定性

将本发明制备的双基因缺失突变菌株在改良的 TSA 培养基连续传代 10 次, 用 PCR 鉴定, 看每一代的突变菌株是否都能扩增出 0.5kb 的 *apxIC* 和 0.48kb 的 *apxIIC* 基因特异性片段。若不能, 表明本发明的突变菌株是能够稳定遗传的。具体 PCR 操作方法: 提取双基因缺失突变菌株基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增。扩增反应在 25 μ L 的体系中进行, 反应体系如下: 模板基因组 DNA (1:100 质粒 DNA) 1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 1.25 μ L, 10 μ mol/L P₁ 0.25 μ L, 10 μ mol/L P₂ 0.25 μ L, 1mmol/L dNTPs 1 μ L, TaqE 0.5 μ L,

ddH₂O 16 μL。扩增条件为：95℃变性 5 min 后进入循环，循环参数为 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 30 sec。32 个循环后，72℃延伸 7 min。结果如图 10 所示：本发明制备的双基因缺失突变菌株能够稳定遗传。

8、猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗（实验编号：SJ01/apxIC-/apxIIC-）的制备

将获得的猪胸膜肺炎放线杆菌双基因缺失突变菌株（实验编号：SJ01/apxIC-/apxIIC-）进行鉴定，每代接种于改良的 TSA 培养基上，该培养基以 TSA 培养基为基本成分，附加按体积比为 1% 的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 10% 的小牛血清，利用胸膜肺炎放线杆菌的 apxIC、apxIIC 基因进行 PCR 检测鉴定重组细菌的遗传稳定性，经 20 次传代后发现仍然不能扩增出大小分别为（500bp）apxIC 和（480bp）apxIIC 基因，遗传性稳定。通过 Western-blotting 检测 ApxIA 和 ApxIIA 毒素蛋白可以在突变菌株中能够稳定的表达，并具有良好的生物学活性。该猪胸膜肺炎放线杆菌双基因缺失突变菌株在改良的 TSA（附加按体积比为 1% 的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 10% 的小牛血清）固体培养基上培养，挑取单菌落于改良的 TBS（以 TBS 培养基为基本培养基，附加按体积比为 1% 的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 10% 的小牛血清）固体培养基上培养，直到活细菌浓度达到 2×10^8 CFU/mL，按细菌液：明胶保护剂（体积/体积）为 7:1 的比例加入明胶保护剂（该明胶保护剂配制方法是：每 100ml 去离子水中加蔗糖 40g，明胶 8g，充分融化后，置 121℃ 下灭菌 30min 后保存备用），于灭菌冻干瓶中按 2.0mL/瓶分装，置 -50℃ 冷冻干燥机中冻干，冻干 36-40h 后压盖，复苏后确定没有杂菌污染，置 -20℃ 保存备用，作为研制基因缺失疫苗的疫苗菌株。

9、猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗（SJ01/apxIC-/apxIIC-）的安全性评价

为测定构建的基因缺失疫苗菌株（SJ01/apxIC-/apxIIC-）对 Bab/C 小鼠的安全性，将 60 只 Bab/C 小鼠平均分为 6 组。其中 3 组每只小鼠注射 0.5 mL 双基因缺失疫苗菌株（SJ01/apxIC-/apxIIC-），活菌浓度从低到高依次为 2×10^8 CFU, 1×10^9 CFU, 2×10^9 CFU；另 3 组每只小鼠注射 0.5mL APP 血清 1 型亲本株，浓度依次为 2×10^7 CFU, 1×10^8 CFU, 2×10^8 CFU，通过小鼠死亡率，评价双基因缺失疫苗菌株（SJ01/apxIC-/apxIIC-）与亲本株（SJ01）相比毒力是否减弱以及对小鼠是否安全。

结果见表 1：用亲本株 3 个浓度注射小鼠后，最低浓度（ 2×10^7 CFU）只有一只小鼠死亡，最高浓度（ 2×10^8 CFU）使小鼠全部死亡；而本发明的双基因缺失疫苗菌株（SJ01/apxIC-/apxIIC-）注射的小鼠，最低浓度（ 2×10^8 CFU）到最高浓度（ 2×10^9 CFU）没有小鼠死亡，表明本发明的双基因缺失突变菌株（SJ01/apxIC-/apxIIC-）与亲本株相比，毒力明显降低且对小鼠是安全的。

表 1 本发明的双基因缺失疫苗菌株与亲本株毒力比较试验

试验菌株	感染剂量	死亡数量/试验总数	致弱参数 ^a
亲本株 (SJ01) (对照 1)	2×10^8	10/10	1
	1×10^8	2/10	
	2×10^7	1/10	
本发明的双基因缺失疫苗菌株	2×10^9	0/10	100
	1×10^9	0/10	

(SJ01/apxIC - /apxIIC -) (对照 2)	2×10^8	0/10	
--------------------------------------	-----------------	------	--

将本发明制备的双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC - /apxIIC -) 按每头猪注射 2mL (含 2×10^8 CFU 活菌数) 接种 6 周龄的仔猪, 部分接种仔猪出现轻度的一过性的发热、体温升高反应, 两天后恢复正常, 在此期间注射本发明制备的基因缺失疫苗的仔猪的精神食欲正常, 未见异常变化, 可以检测到胸膜肺炎放线杆菌间接血凝菌体抗体和毒素抗体。亲本菌株 SJ01 接种的仔猪 (即对照 1), 第二天全部呈现发热、体温升高、呼吸困难等反应, 持续一周, 并有一头死亡, 剖检发现具有典型的猪传染性胸膜肺炎病理变化; 而对照组 2 既没有体温升高, 也没有异常临床表现。按每头猪注射 2mL (含 2×10^8 CFU 活菌数) 接种本发明的 SJ01/apxIC - /apxIIC - 双基因缺失疫苗和未接种的妊娠母猪, 窝产仔数基本相当, 均没有出现死胎、木乃伊胎等, 证实本发明制备的基因缺失疫苗对妊娠母猪也是安全的。

8. 猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC - /apxIIC -) 在小鼠体内的免疫效力检测

1) 小鼠的免疫程序:

选择体重为 18g 左右的 Balb/c 小鼠作为免疫效力评价, 根据试验要求分为 3 组, 分别为本发明制备的双基因缺失疫苗免疫组 (SJ01/apxIC - /apxIIC -)、单基因缺失疫苗组 (apxIIC -)、三价灭活疫苗免疫组和非免疫空白对照组, 每组 10 只, 免疫途径为腹腔注射 0.5mL (含 2×10^8 CFU 活菌量) 细菌液或 TSB 培养基 (购自美国 GIBCO 公司), 分别于免疫前 0 天、首免后 14 天和 28 天检测 APP 间接血凝抗体 (HIA, 操作方法参照中国农业科学院兰州兽医研究所 APP 间接血凝抗体检测试剂盒说明书) 以及毒素 ApxI 抗体水平 (方法参照刘建杰等, 猪胸膜肺炎放线杆菌毒素 I 基因的克隆、表达及其 ELISA 检测方法的建立, 中国农业科学, 37 (1): 148-151, 2004)、ApxII 抗体水平 (方法参照梁望旺等, 猪胸膜肺炎放线杆菌毒素 II 蛋白的表达、纯化及其间接 ELISA 检测方法的建立与应用, 中国兽医学报, 25 (2): 145-147, 2005)。

2) 免疫小鼠体液免疫抗体水平检测

小鼠免疫前采血, 第二、三次采血分别在首免后 14、28 天进行, 经尾静脉负压采血, 分离血清, 检测 APP 全菌抗体和特异性抗 APP 的 ApxI 抗体 (方法参照刘建杰等, 猪胸膜肺炎放线杆菌毒素 I 基因的克隆、表达及其 ELISA 检测方法的建立, 中国农业科学, 37 (1): 148-151, 2004)、ApxII ELISA 抗体 (方法参照梁望旺等, 猪胸膜肺炎放线杆菌毒素 II 蛋白的表达、纯化及其间接 ELISA 检测方法的建立与应用, 中国兽医学报, 25 (2): 145-147, 2005)。结果见表 2。从表 2 中可以看出, 首免后第 2 周本发明制备的基因缺失疫苗组和灭活疫苗免疫组全部转阳, 首免后 2 周, 本发明制备的双基因缺失疫苗诱导产生的间接血凝抗体效价在 1: 8~1: 32 之间, ApxIA ELISA 和 ApxIIA ELISA 抗体水平在 1: 160~1: 320。而灭活疫苗组诱导产生的间接血凝抗体效价在 1: 4~1: 16 之间, ApxIA ELISA 和 ApxIIA ELISA 抗体水平小于 1: 40。而同步进行的 TSB 对照均为阴性。二免后 2 周 (即首免后 4 周), 本发明制备的双基因缺失疫苗和灭活疫苗免疫组产生的无论是间接血凝还是 ELISA 抗体均有一定程度的上升。

本发明制备的双基因缺失疫苗二种检测方法所产生的抗体效价高于灭活疫苗组，其间接血凝抗体效价在 1: 64~1: 256 之间，而 ApxIA ELISA 和 ApxIIA ELISA 抗体水平在 1: 640~1: 2560 之间，TSB 对照组抗体检测仍为阴性。上述结果表明本发明制备的双基因缺失疫苗免疫小鼠后能诱导机体产生特异性的抗 APP 的体液免疫应答。

表 2 本发明制备的双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻) 免疫小鼠血清抗体检测 (HIA 和 ELISA 法)

试验分组	间接血凝效价 (HIA)		ApxIA ELISA 抗体效价		ApxIIA ELISA 抗体效价	
	首免 2 周	首免 42 周	首免 2 周	首免 42 周	首免 2 周	首免 4 周
本发明的双基因缺失疫苗组	1: 8-1: 32	1: 64-1: 256	1: 160-1: 320	1: 640-1: 2560	1: 160-1: 320	1: 160-1: 2560
灭活疫苗组	1: 4-1: 16	1: 64-1: 128	<1: 40	<1: 40	<1: 40	<1: 40
TSB 对照组	1: 2	1: 2-1: 4	<1: 40	<1: 40	<1: 40	<1: 40

3) 胸膜肺炎放线杆菌攻击双基因缺失疫苗免疫 Balb/C 小白鼠的保护性试验:

将 20 克左右胸膜肺炎放线杆菌阴性 Bab/C 小鼠 48 只, 平均分为三个大组(或 6 个小组), 即本发明制备的基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻)、灭活疫苗对照组、TSB 对照组。基因缺失疫苗组以 0.5mL (活菌含量 2×10^8 CFU) 培养液通过腹腔注射 Bab/C 小鼠。灭活疫苗对照组每只小鼠通过腹腔注射 0.5mL 灭活疫苗; TSB 对照组只腹腔注射 0.5mL TSB 培养基。

免疫后第 4 周, TSB 对照组、灭活疫苗对照组和基因缺失疫苗组分别用 2LD₅₀ APP 血清 7 型菌 (活菌含量 1×10^8 CFU) 和 2LD₅₀ APP 血清 1 型 (活菌含量 2×10^8 CFU) 对免疫小鼠进行攻毒。结果, APP 血清 7 型和 1 型菌攻击的 TSB 对照组 12h 内小鼠全部死亡, 死亡小鼠肺部有出血, 从心血和肺脏能分离攻毒用 APP。灭活疫苗对照组 APP 血清 7 型攻击的 8 只小鼠死亡 2 只, 而 APP 血清 1 型攻击的 8 只小鼠死亡 1 只, 死亡小鼠解剖可见肺部出血。本发明制备的双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻) 用 APP 血清 1 型菌攻毒的 8 只小鼠没有死亡, 小鼠攻毒开始 24h 内呈现精神沉郁、不食、扎堆, 之后逐步恢复正常, 观察到第三天和攻毒前没有差别。而用 APP 血清 7 型菌攻毒的 8 只小鼠, 死亡 1 只, 其余小鼠攻毒后 24h 精神沉郁、不食、扎堆, 之后逐步恢复正常。结果说明了以亲本菌株 SJ01 血清 1 型研制的双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻) 免疫鼠可以完全保护同源血清 1 型菌攻击, 而对异源血清 7 型菌攻击只有 7/8 (87.5%) 保护, 但仍然优于传统的灭活疫苗。攻毒后保护率情况见表 3 所示。

表 3 本发明制备的双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻) 对 APP 攻击 Balb/C 小白鼠的保护性

实验分组	攻毒 APP 血清型菌株	存活小鼠/试验小鼠	保护率 (%)
TSB 对照组	7	0/8	0
	1	0/8	0
灭活疫苗对照组	7	7/8	87.5
	1	6/8	75
本发明的双基因缺失疫苗	7	7/8	87.5

苗 (SJ01/apxIC ⁻ /apxIIC ⁻) -) 试验组	1	8/8	100
---	---	-----	-----

9. 猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻) 在仔猪体内的免疫效力检测

1) 猪的免疫程序:

选择猪传染性胸膜肺炎阴性、40-50日龄的断奶仔猪24头, 试验分3组, 第一组为TSB对照组, 编号1~8, 第二组为灭活疫苗对照组, 编号9~16, 第三组为双基因缺失疫苗组 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻), 编号17~24。

TSB对照组每头猪注射1mL TSB培养基, 灭活疫苗对照组每只猪颈部肌肉注射灭活疫苗2 mL, 而本发明的双基因缺失疫苗免疫组 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻) 通过气管和肌肉注射培养液1mL (活菌含量 1×10^9 CFU), 免疫2次, 间隔2周。在一免后2周和二免后2周各采血一次, 分别用间接血凝试验 (参照中国农业科学院兰州首义研究所, APP间接血凝抗体检测试剂盒说明书) 和毒素ApxI抗体水平 (方法参照刘建杰等, 猪胸膜肺炎放线杆菌毒素I基因的克隆、表达及其ELISA检测方法的建立, 中国农业科学, 37(1): 148-151, 2004)、ApxII抗体水平 (参照梁望旺等, 猪胸膜肺炎放线杆菌毒素II蛋白的表达、纯化及其间接ELISA检测方法的建立与应用, 中国兽医学报, 25(2): 145-147, 2005)

试验分组、免疫途径和免疫剂量详细情况见表4。

表4 猪胸膜肺炎放线杆菌双基因缺失疫苗免疫仔猪试验动物分组设计

组 别	免 疫 方 案
本发明的双基因缺失疫苗免疫组 (NO. 3)	以1mL (活菌含量 1×10^9 CFU) 本发明制备的基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC ⁻ /apxIIC ⁻ 免疫猪, 免疫后14天用同样剂量加免一次
灭活疫苗组 (NO. 2)	按照武汉科前生物制品有限公司产品使用说明进行免疫, 每头猪免疫1头份, 即2mL剂量。
TSB对照组 (NO. 4)	每头猪注射与基因缺失疫苗免疫组相同体积的TSB培养基, 免疫后14天用同样剂量注射一次。

2) 免疫仔猪间接血凝抗体水平检测

首免后第2和第4周 (二免后第2周) 前腔静脉采血, 分离血清, 检测APP间接血凝抗体 (操作方法按兰州兽医研究所的间接血凝检测方法对菌体的血凝抗体进行测定), 以血清效价大于或等于1:16判为阳性。结果见表5, 从表中可以看出, 首免后2周, 本发明制备的基因缺失疫苗能够诱导免疫仔猪产生一定水平的APP间接血凝抗体; 首免后4周, 本发明制备的基因缺失疫苗免疫组APP间接血凝抗体水平有上升。无论是首免后2周还是首免后4周, 本发明制备的双基因缺失疫苗SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻诱导的APP间接血凝抗体高于灭活疫苗,

这表明毒素激活基因的缺失并不影响双基因缺失疫苗的免疫原性。

表5 本发明制备的双基因缺失疫苗(SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻)免疫仔猪APP间接血凝抗体检测结果

组别 (30头/组)	间接血凝(HIA)抗体水平	
	首免后2周	首免后4周
双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC ⁻ /apxIIC ⁻)	1:64±4.81	1:128±6.54
灭活疫苗	1:16±5.76	1:32±7.41
TSB对照组	1:2±0.365	1:2±0.35

3) APP特异性毒素ApxIA、ApxIIA ELISA抗体

分别在第一次2周和第二次免疫后2周前腔静脉采血,分离血清,采用间接ELISA检测分别检测ApxIA ELISA抗体(方法参照刘建杰等,猪胸膜肺炎放线杆菌毒素I基因的克隆、表达及其ELISA检测方法的建立,中国农业科学,37(1):148-151,2004)和ApxIIA ELISA抗体(方法参照梁望旺等,猪胸膜肺炎放线杆菌毒素II蛋白的表达、纯化及其间接ELISA检测方法的建立与应用,中国兽医学报,25(2):145-147,2005),结果见表7:TSB对照组ApxIA抗体无论一免或二免都维持在阴性水平,平均OD₆₃₀值分别为0.16和0.19,与免疫前OD₆₃₀平均0.18相比没有差别;灭活疫苗对照组免疫前平均值OD₆₃₀为0.21,免疫后第一次平均值为0.41,而第二次平均值为0.58;而双基因缺失疫苗免疫断奶仔猪,首免后2周ELISA抗体OD₆₃₀平均值为0.57,二免后2周ELISA抗体明显上升,OD₆₃₀平均值为0.76,ApxIA抗体水平总体情况见表6所示。

表6 本发明制备的双基因缺失疫苗(SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻)免疫仔猪APP ApxIA-ELISA抗体检测结果

组别 (30头/组)	ApxIA-ELISA抗体水平(平均OD ₆₃₀)	
	首免后2周	首免后4周
SJ01/apxIC ⁻ /apxIIC ⁻	0.57±2.41	0.76±3.51
灭活疫苗	0.41±4.36	0.58±4.41
TSB对照组	0.16±0.56	0.19±0.24

同样,TSB对照组ApxIIA抗体无论一免或二免都维持在阴性水平,平均OD₆₃₀值分别为0.19和0.20,与免疫前OD₆₃₀平均0.18相比没有差别;灭活疫苗对照组免疫前平均值OD₆₃₀为0.20,免疫后第一次平均值为0.37,而第二次平均值为0.48;而双基因缺失疫苗免疫断奶仔猪,首免后2周ELISA抗体OD₆₃₀平均值为0.59,二免后2周ELISA抗体明显上升,OD₆₃₀

平均值为 0.74, ApxII 抗体水平总体情况见表表 7。

表 7 本发明制备的双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻) 免疫仔猪
APP ApxIIA-ELISA 抗体检测结果

组 别 (30 头/组)	间接血凝 (HIA) 抗体水平 (平均 OD630)	
	首免后 2 周	首免后 4 周
SJ01/apxIC ⁻ /apxIIC ⁻	0.59±3.51	0.74±5.56
灭活疫苗	0.37±5.76	0.48±7.24
TSB 对照组	0.19±0.38	0.20±0.25

4) 免疫仔猪攻毒保护率试验

二免后 2 周 TSB 对照组 1~4 号、灭活疫苗对照组 9~12 号、本发明的双基因缺失疫苗组 17~20 号猪通过气管用 2.0mL (活菌含量 1×10^9 CFU) APP 血清 1 型菌 (菌株号 S4074, 标准菌株, 由澳大利亚动物保健研究所 Dr. Pat Blackall 赠送) 培养液攻毒; 而对照组 5~8 号、灭活疫苗对照组 13~16 号、本发明的双基因缺失疫苗试验组 21~24 号猪用 2.0 mL (活菌含量 2×10^9 CFU) APP 血清 7 型菌 (菌株号 WH83, 标准菌株, 由澳大利亚动物保健研究所 Dr. Pat Blackall 赠送) 培养液气管攻毒。连续观察 1 周, 观察临床症状并最后计算攻毒保护率情况。结果说明以 SJ01 血清 1 型研制的双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻) 免疫断奶仔猪可以完全保护同源血清 1 型攻击, 而对异源血清 7 型攻击只有 75% 保护, 但仍然优于传统的灭活疫苗。攻毒后保护率情况见表 8

表 8 本发明制备的双基因缺失疫苗 (SJ01/apxIC⁻/apxIIC⁻) 免疫仔猪
后攻毒保护结果

组别	编号	临床症状						保护率	分离细菌 g
		肺炎 ^a	胸膜炎 ^b	呼吸频率 ^c	呼吸困难 ^d	嗜睡 ^e	食欲 ^f		
TSB 对照组 (APP-1 攻毒)	1	+++	+++	22	3	3	1	0%	+
	2	++	++	23	3	3	1		+
	3	+++	+++	26	3	3	1		-
	4	+++	+++	25	3	3	1		+
TSB 对照组 (APP-7 攻毒)	5	+++	+++	19	2	3	1	25%	+
	6	++	++	20	3	2	1		+
	7	++	++	17	2	3	1		-
	8	+++	+++	20	3	2	1		+
灭活疫苗对照	9	+	+	15	0	3	0	50%	+

组(APP-1 攻毒)	10	++	++	14	2	1	0		+
	11	++	++	15	3	3	1		+
	12	+	+	14	1	0	0		+
灭活疫苗对照	13	+	+	9	0	0	0		+
组(APP-7 攻毒)	14	+	+	11	1	1	0	75%	-
	15	+	+		3	3	1		+
	16	+	+	9	0	0	0		+
本发明双基因	17	+	+	10	0	1	0		-
缺失疫苗组	18	+	+	9	0	0	0	100%	-
(APP-1 攻毒)	19	++	++	22	3	2	1		-
	20	+	+	10	0	1	0		+
本发明双基因	21	-	-	8	1	0	0		-
缺失疫苗组	22	-	-	9	1	0	0	75%	-
(APP-7 攻毒)	23	+	+	10	2	0	0		-
	24	-	-	8	1	0	0		-

a,b 肺炎和胸膜炎的病变程度：-，无；+，轻微；++，中等程度；+++，严重

c 呼吸频率：每 15 秒的呼吸次数

d 呼吸困难：0，正常；1，轻微；2，中等程度；3，严重

e 嗜睡程度：0，正常；1，轻微；2，中等程度；3，严重

f 食欲情况（36h 内）：0，吃食；1，不吃食。

g 细菌分离：+，从肺部能分离；-，不能分离。

本发明实施例的试验结果显示，本发明的猪传染性胸膜肺炎双基因缺失疫苗(SJ01/apxIC-1/apxIIC-1)能激发机体产生高效价 APP 的间接血凝抗体，以及产生针对猪猪胸膜肺炎放线杆菌 SJ01 血清 1 型毒素 ApxIA、ApxIIA 特异性 ELISA 抗体并好于 APP 三价灭活疫苗免疫组产生的抗体，攻毒保护率也高于灭活疫苗。

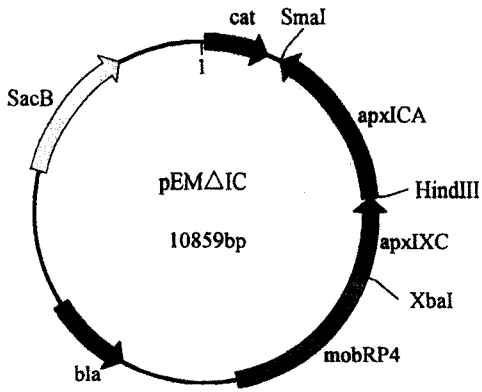


图 1A

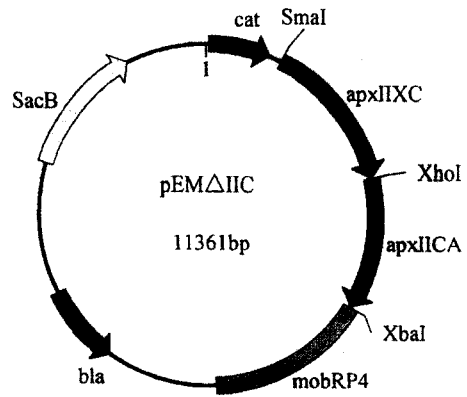


图 1B

图 1

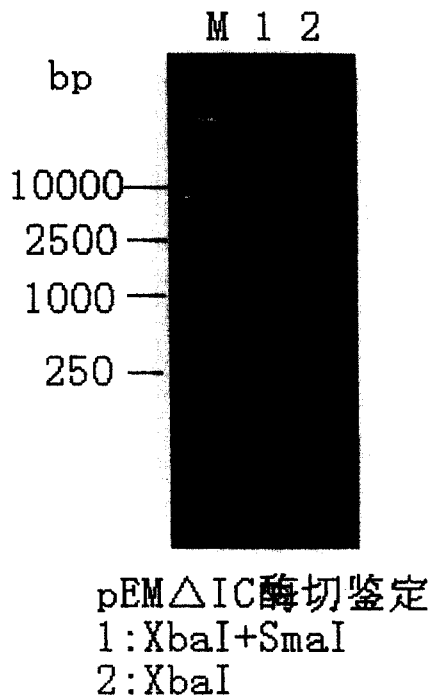


图 2

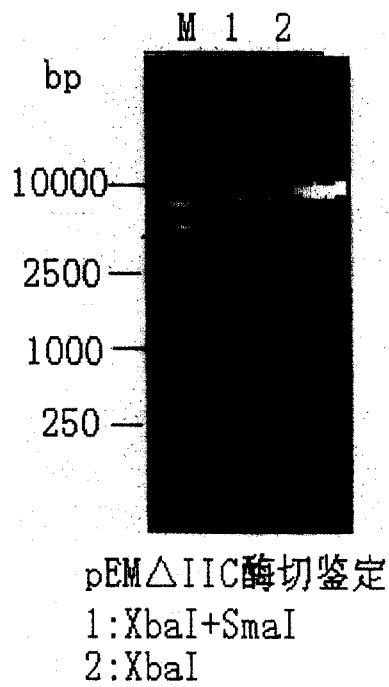


图 3

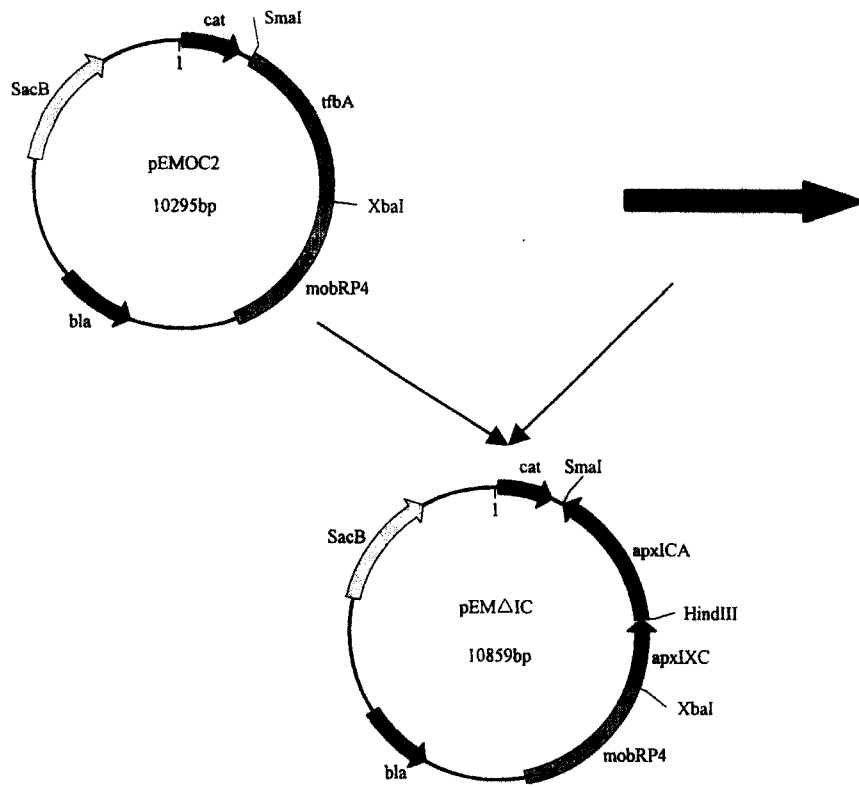


图 4

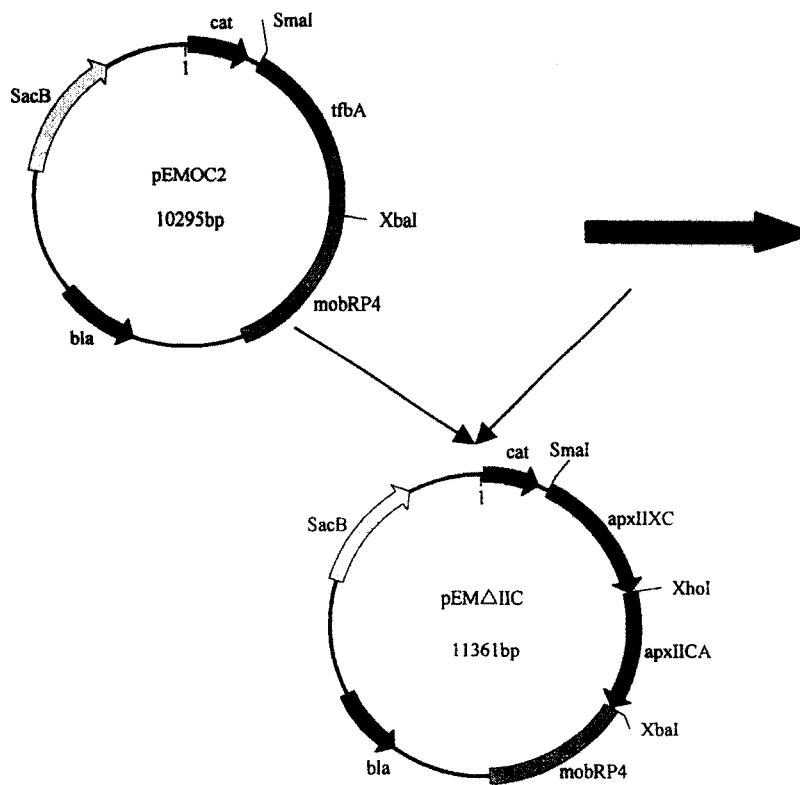


图 5

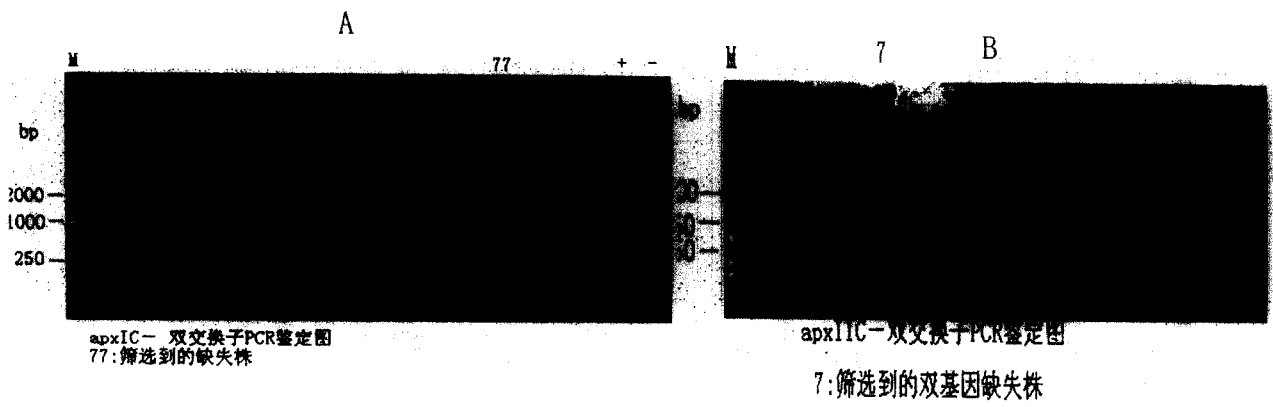


图 6A

图 6B

图 6

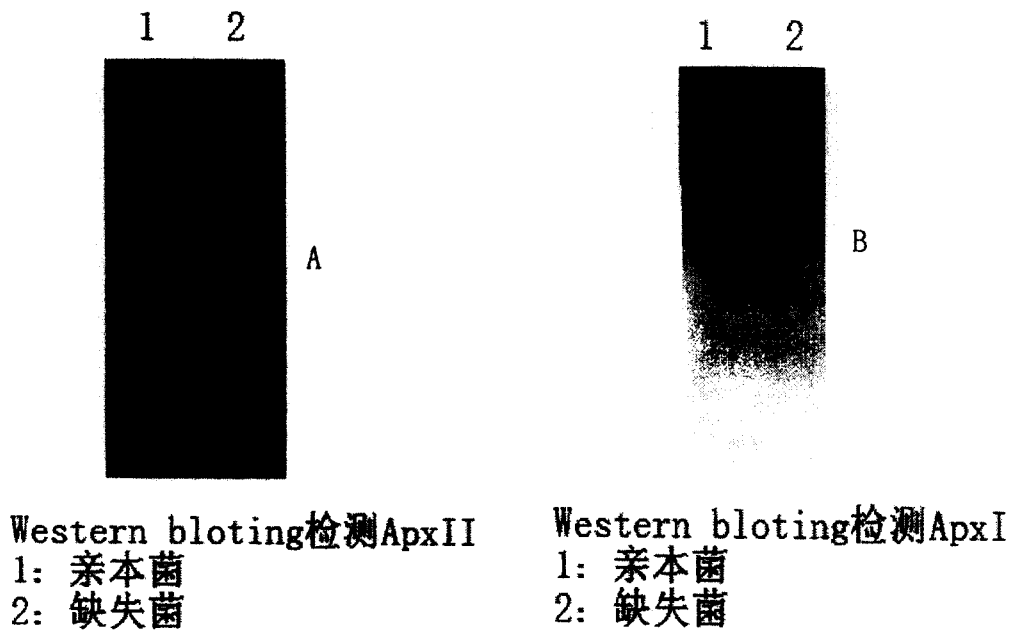


图 7A

图 7B

图 7

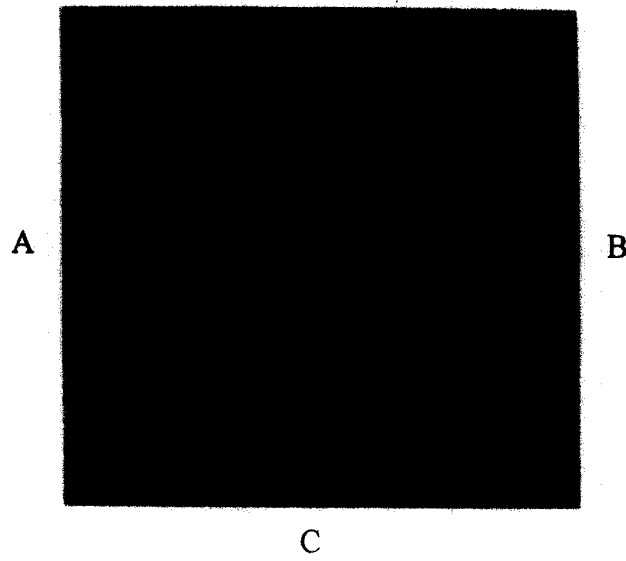


图 8

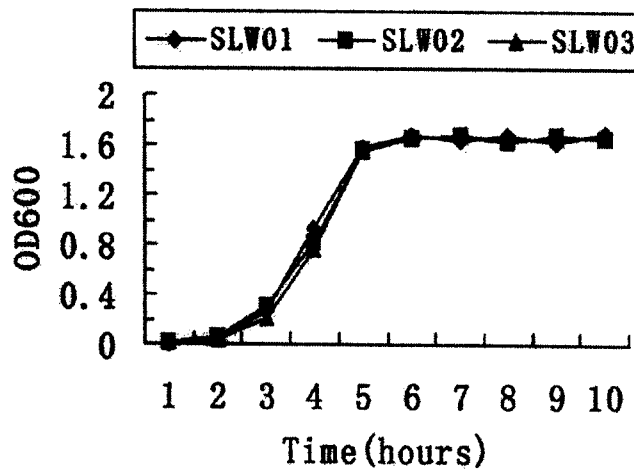


图 9

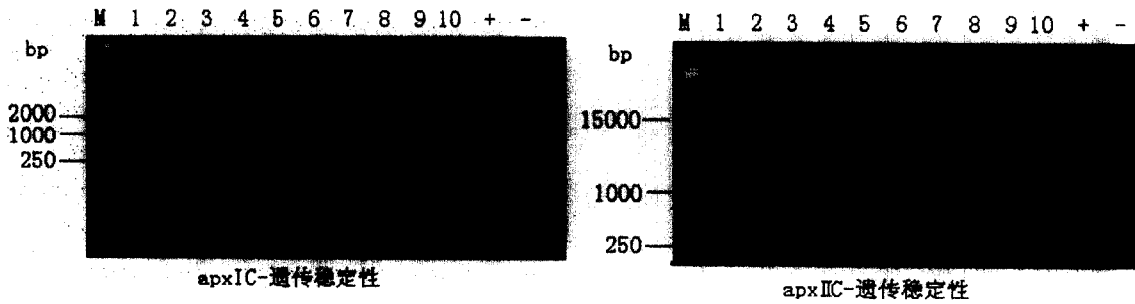


图 10