(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2014 年 3 月 27 日 (27.03.2014)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2014/043838 A1

(51) 国际专利分类号:
*A61K 39/108* (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/001677

(22) 国际申请日: 2012 年 12 月 10 日 (10.12.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201210357304.4 2012 年 9 月 24 日 (24.09.2012) CN

(71) 申请人: **河北科星药业有限公司 (HEBEI KEXING PHARMACEUTICAL CO., LTD)** [CN/CN]; 中国河北省石家庄鹿泉市高新技术开发区昌盛大街 114 号张鑫, Hebei 050200 (CN)。

(72) 发明人: **张鑫 (ZHANG, Xin)**; 中国河北省石家庄鹿泉市高新技术开发区昌盛大街 114 号, Hebei 050200 (CN)。 **马兴树 (MA, Xingshu)**; 中国河北省石家庄鹿泉市高新技术开发区昌盛大街 114 号, Hebei 050200 (CN)。 **牛志勇 (NIU, Zhiyong)**; 中国河北省石家庄鹿泉市高新技术开发区昌盛大街 114 号, Hebei 050200 (CN)。 **陈淑芳 (CHEN, Shufang)**; 中国河北省石家庄鹿泉市高新技术开发区昌盛大街 114 号, Hebei 050200 (CN)。 **刘志辉 (LIU, Zhihui)**; 中国河北省石家庄鹿泉市高新技术开发区昌盛大街 114 号, Hebei 050200 (CN)。

(74) 代理人: **石家庄科诚专利事务所 (SHIJIAZHUANG KECHENG PATENT OFFICE)**; 中国河北省石家庄市广安大街 86 号财富大厦 A 座 1106 室, Hebei 050011 (CN)。

(81) **指定国** (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

[见续页]

(54) **Title**: METHOD OF PREPARING BROAD SPECTRUM VACCINE FOR PREVENTING AVIAN COLIBACILLOSIS

(54) **发明名称** : 预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法

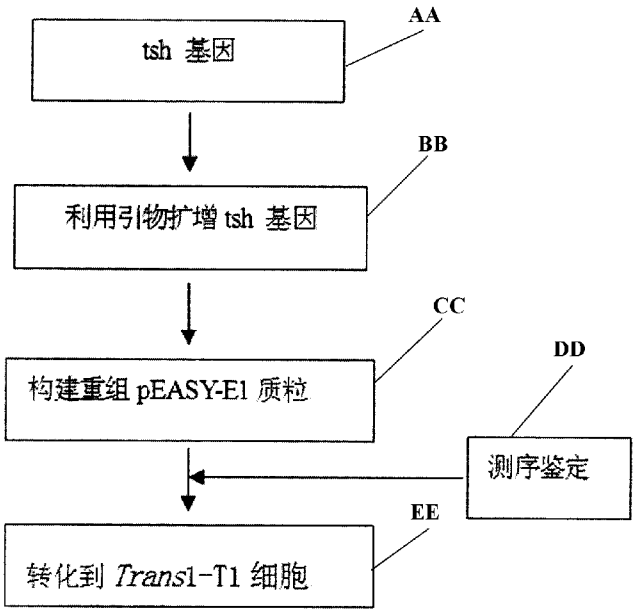


图 2 /Fig.2

AA TSH GENE
BB USING PRIMERS TO AMPLIFY THE TSH GENE
CC CONSTRUCTING A RECOMBINANT PEASY-E1 PLASMID
DD SEQUENCING AND IDENTIFICATION
EE TRANSFORMING INTO TRANS1-T1 CELLS

(57) **Abstract**: The present invention discloses a method of preparing a broad spectrum vaccine for preventing avian colibacillosis, including recombining the tsh gene, which has an adhesive attraction effect, with E.coli BL21 (DE3); the resulting vaccine may preferentially bind to the corresponding receptors on avian body cells, resulting in there being no receptors to bind to the pathogenic E.coli, thus decreasing morbidity rates among avians.

(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。

WO 2014/043838 A1

QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) **指定国** (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**本国际公布**:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

# 说 明 书

## 预防禽类大肠杆菌病的广谱菌苗的制备方法

### 技术领域

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

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。

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

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。

为解决上述技术问题，本发明所采取的技术方案是:

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:

（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 *Trans*1-T1 克隆感受态细胞中;

③对 *Trans*1-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。

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:

上游引物为 zx1: 5’-atgaacagaatttattctcttcgc-3’

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

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:

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;

置于 4℃冰箱保存，即得扩增后的温度敏感血凝素 tsh 基因。

作为本发明的第三种限定，步骤②具体操作如下:

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、加上述重组质粒于 50μL *Trans*1-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、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;

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 *Trans*1-T1 细胞。

作为进一步限定:

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;

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。

作为本发明的第三种限定，步骤③具体操作如下:

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，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管中，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。

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 Plasmid Mini Kit Ⅰ D6943-01*型号的 OMEGA 公司生产的的试剂盒中的组成。

作为本发明的第五种限定，步骤（2）的具体操作如下:

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;

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;

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。

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。

本发明还有一种限定，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(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。

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:

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。

本发明适用于预防禽类大肠杆菌病广谱菌苗的制备。

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

图 1 为 PCR 扩增产物 tsh 基因的 1%琼脂糖凝胶电泳图;

图 2 为重组大肠杆菌 *Trans*1-T1 的构建流程图;

图 3 为重组 pEASY-E1 载体的 PCR 鉴定结果;

图 4 为重组大肠杆菌 BL21 (DE3) 的 PCR 鉴定结果;

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

实施例

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:

(1) 重组质粒的构建 (重组大肠杆菌 *Trans*1-T1 的构建流程, 如图 2 所示)

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;

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'。

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 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;

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。

其中，PCR扩增反应体系如表1所示:

表1 PCR扩增反应体系

| 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 |

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。

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*Trans*1-T1克隆感受态细胞中；

具体操作如下:

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；

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:

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

B1、加上述重组质粒于 50μL *Trans*1-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、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;

其中，步骤 D1 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。

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 *Trans*1-T1 细胞;

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。

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:

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 ctcaggggggc 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

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

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

③对 *Trans*1-T1 克隆感受态细胞进行培养，并提取质粒;

具体操作如下:

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

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

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管中，13000 g 离心 1min，弃去流出液;

I2、加入 500μL HB Buffer，13000 g 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；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;

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。

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 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*型号的试剂盒中的组成。

（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;

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;

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。

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，(引物用 zx1 和 T7 terminator primer ) 其中 T7 terminator 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 。

(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 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;

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:

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。

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;

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;

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。

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：

| 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 |

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。

# 权 利 要 求 书

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 *Trans*1-T1 克隆感受态细胞中;

③对 *Trans*1-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。

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，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’。

3、根据权利要求 1 或 2 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。

4、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 *Trans*1-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、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;

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 *Trans*1-T1 细胞。

5、根据权利要求 4 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。

6、根据权利要求 4 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;

7、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。

8、根据权利要求7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。

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（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。

10、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。

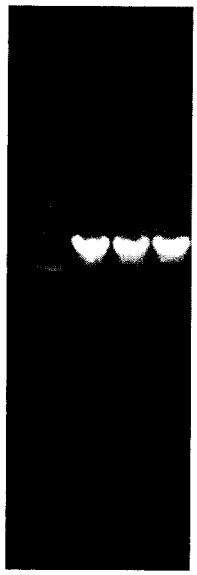

图 1

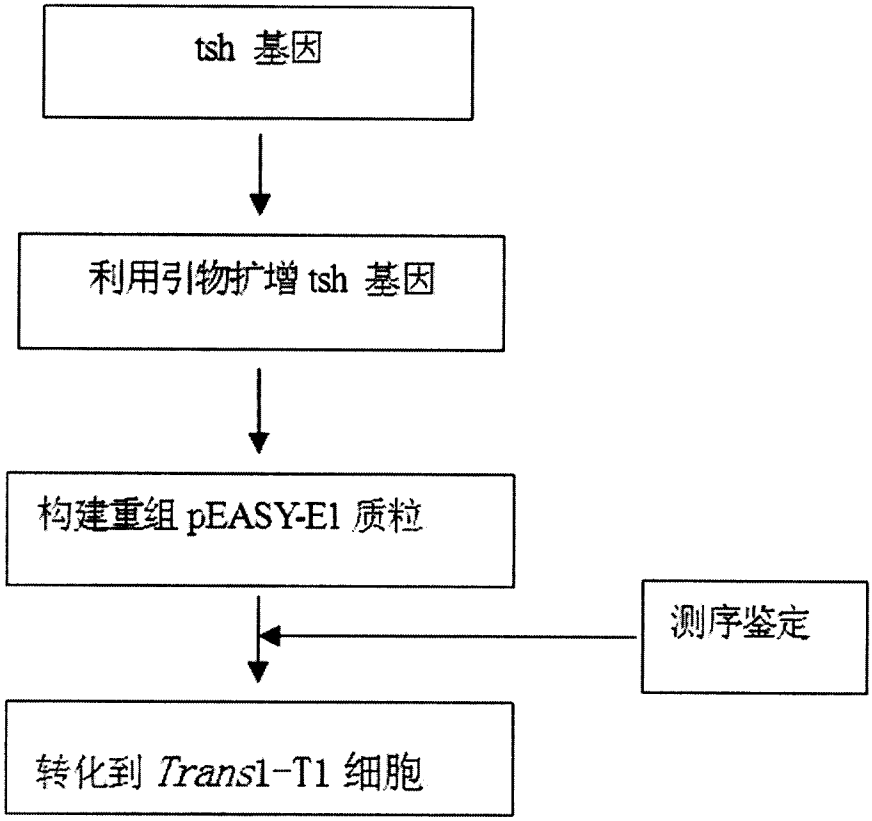


图 2

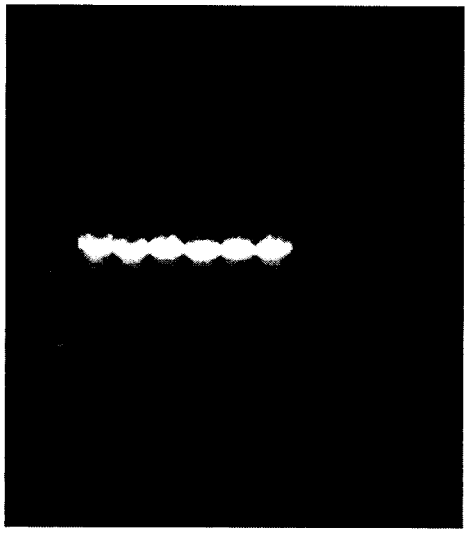

图 3

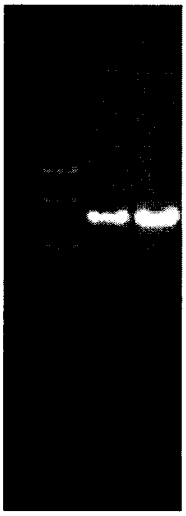

图 4

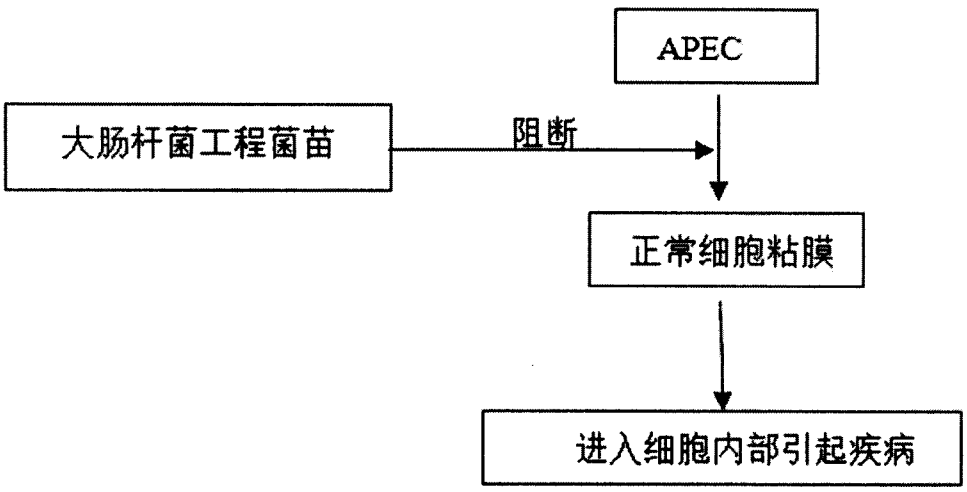


图 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/001677

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNTXT, CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, ISI Web of Knowledge, PUBMED: APEC, Escherichia coli , tsh, avian colibacillosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | E.-M. Antao et al., The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic Escherichia coli (APEC), Microbial Pathogenesis, 2008, no. 45, pages 361-369 | 1-10 |
| A | CN 1315871 A (MEGAN HEALTH INC.) 03 October 2001 (03.10.2001), see the abstract | 1-10 |
| A | CN 101096706 A (UNIV YANGZHOU) 02 January 2008 (02.01.2008), see the abstract | 1-10 |
| A | CN 102580074 A (BEIJING DABEI AGRIC SCI&TECHNOLOGY GRO) 18 July 2012 (18.07.2012), see the abstract | 1-10 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 19 June 2013 (19.06.2013) | 04 July 2013 (04.07.2013) |
| Name and mailing address of the ISA<br>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao<br>Haidian District, Beijing 100088, China<br>Facsimile No. (86-10) 62019451 | Authorized officer<br>ZHANG, Yanxia<br>Telephone No. (86-10) 62411049 |

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 2009)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/001677

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/001677

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
A61K 39/108 (2006.01) i

A61P 31/04 (2006.01) i

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/001677

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|---|---|---|
| CN 1315871 A | 03.10.2001 | US 6399074 B1 | 04.06.2002 |
| | | EP 1100536 A2 | 23.05.2001 |
| | | WO 0004919 A2 | 03.02.2000 |
| | | BR 9912410 A | 15.01.2002 |
| | | AU 4991499 A | 14.02.2000 |
| | | ZA 200100976 A | 31.10.2001 |
| | | MX 2001000884 A1 | 01.06.2002 |
| | | JP 2002521345 T | 16.07.2002 |
| CN 101096706 A | 02.01.2008 | None | |
| CN 102580074 A | 18.07.2012 | None | |

# 国际检索报告

国际申请号
**PCT/CN2012/001677**

**A. 主题的分类**

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

**B. 检索领域**

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K，A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNPAT, CNTXT, CPRSABS，CNABS，DWPI，SIPOABS，VEN，CJFD，CNKI，ISI Web of Knowledge，PUBMED: APEC，大肠杆菌，tsh，avian colibacillosis

**C. 相关文件**

| 类　型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| A | E.-M. Antao 等，The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic Escherichia coli (APEC)，Microbial Pathogenesis， 2008，第 45 期，第 361-369 页 | 1-10 |
| A | CN 1315871 A（梅根保健股份有限公司）3.10 月 2001（03.10.2001），参见摘要 | 1-10 |
| A | CN 101096706 A（扬州大学）2.1 月 2008（02.01.2008），参见摘要 | 1-10 |
| A | CN 102580074 A（北京大北农科技集团股份有限公司） 18.7 月 2012（18.07.2012），参见摘要 | 1-10 |

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

| 国际检索实际完成的日期 | 国际检索报告邮寄日期 |
|---|---|
| 19.6 月 2013（19.06.2013） | **04.7 月 2013 (04.07.2013)** |
| ISA/CN 的名称和邮寄地址：<br>中华人民共和国国家知识产权局<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088<br>传真号： (86-10)62019451 | 受权官员<br>张艳霞<br>电话号码：(86-10) **62411049** |

国际检索报告

国际申请号
**PCT/CN2012/001677**

**第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第 1 页第 1.c 项)**

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的**核苷酸和/或氨基酸序列**, 国际检索是在下列基础上进行的：

a. 序列表的提交或提供

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. 提交或提供时间

☐ 包含在申请提交时的国际申请中

☒ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2、☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见

# 国际检索报告

国际申请号
**PCT/CN2012/001677**

主题的分类：

A61K39/108（2006.01）i

A61P31/04（2006.01）i

# 国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
**PCT/CN2012/001677**

| 检索报告中引用的专利文件 | 公布日期 | 同族专利 | 公布日期 |
|---|---|---|---|
| CN 1315871 A | 03.10.2001 | US 6399074 B1 | 04.06.2002 |
| | | EP 1100536 A2 | 23.05.2001 |
| | | WO 0004919 A2 | 03.02.2000 |
| | | BR 9912410 A | 15.01.2002 |
| | | AU 4991499 A | 14.02.2000 |
| | | ZA 200100976 A | 31.10.2001 |
| | | MX 2001000884 A1 | 01.06.2002 |
| | | JP 2002521345 T | 16.07.2002 |
| CN 101096706 A | 02.01.2008 | 无 | |
| CN 102580074 A | 18.07.2012 | 无 | |