

幼畜腹泻双价基因工程疫苗(K88、K99)的高密度发酵生产工艺及抗原过量表达

孙玉昆 顾大年 巫爱珍 张文琴 徐安清
蒋浩波 仲毅毅 张志安

(中国科学院上海生物工程中心, 上海)

本文报道了幼畜腹泻双价基因工程疫苗(K88、K99)的高密度发酵生产工艺和抗原基因的过量表达研究结果。采用 New Brunswick 公司发酵罐,主要发酵参数为搅拌速度 1000rpm,通气量为18L/min,溶氧为25%,pH6.5,罐压为48.3kPa,温度37℃,发酵时间为20h。菌体浓度为 A_{600nm} 40以上,K88、K99抗原效价分别达 2^{12} 水平。发酵过程中发现表达的抗原除装配细菌伞毛之外,过量表达的抗原以相当于伞毛中抗原浓度游离存在于溶液中。含双价疫苗基因的表达型质粒的稳定性在发酵20h后保持在70%。本文结果表明利用小型发酵罐(10L发酵液)每次可制备10000支疫苗,完全可以满足对幼畜腹泻基因工程疫苗的大量需要。

关键词 K88、K99双价疫苗;高密度发酵

产生肠毒素的大肠杆菌能使幼畜(仔猪、小牛等)发生急性腹泻引起较高的死亡率。这些致病性大肠杆菌所以能引起幼畜腹泻由二个因素决定,一是靠细菌表面的伞毛附着在新生幼畜小肠上皮细胞表面进行繁殖,二是分泌肠毒素(热稳定与热不稳定二种肠毒素)使幼畜发生急性腹泻^[1,2]。细菌表面的伞毛所含的粘着抗原在猪的产肠毒素大肠杆菌不同分离株中分别表达K88,987P抗原的一种^[3,4],在牛的产肠毒素大肠杆菌分离株中表达K99或F41中的一种。基因工程疫苗是将伞毛粘着抗原蛋白的基因如K88、K99等克隆在一个表达质粒中以大肠杆菌K12为寄主菌进行表达生产制备多价疫苗、同时大肠杆菌K12也不产生肠毒素^[5-8]。

洪孟民等完成并报道从中国野生株致病病毒性大肠杆菌分离K88、K99抗原基因、克隆、表达以及动物试验,获得了预期结果^[9,10]。我们在此基础上继续进行K88、

K99基因工程菌中试规模试验,完成了高密度发酵与疫苗生产工艺研究。

材料与 方法

(一) 材料

1. 细菌菌株: 大肠杆菌C600含K88、K99抗原的表达质粒pTK88-99-8由洪孟民教授提供。

2. M_0 培养基组成(%): NH_4Cl 0.1; $NaCl$ 0.5, Na_2HPO_4 0.6, KH_2PO_4 0.3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 葡萄糖0.4, 蛋白胨0.5。

3. 发酵罐: 美国New Brunswick Scientific Co.产品,容积为16L。

(二) 方法

1. 菌种保存: 含K88、K99抗原基因

本文于1989年3月29日收到。

本文工作系国家合同项目。感谢洪孟民教授提供K88、K99基因工程菌株。

的工程细菌于15%甘油中保存在 -80°C , 或保存表达型质粒。

2. K88、K99抗原蛋白的纯化及相应抗体的制备^[3,9,10]: 产生K88抗原的大肠杆菌野生株(青3)(K88⁺, LT⁺, ST⁺)及产生抗原K99的大肠杆菌K12-K99⁺分别于M₀培养液中37 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养过夜, 离心收集菌体, 将菌体悬浮于1mol/L NaCl-0.1mol/L Tris-HCl, pH7.5缓冲液中, 62 $^{\circ}\text{C}$ 加热5min使伞毛脱落, 离心(5000rpm)除去菌体, 将含伞毛的上清液加(NH₄)₂SO₄至60%饱和度, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 10000rpm离心, 收集沉淀, 再将沉淀溶于2mol/L尿素的pH7.5, 0.1mol/L Tris-HCl缓冲液中, 经Sepharose 4B(2 \times 80cm)层析以同一缓冲液洗脱, 分别纯化K88、K99抗原蛋白, 经SDS-PAGE 12%凝胶电泳证明为单一组份, 透析除去尿素, 加福氏完全佐剂, 按常规方法注射家兔制备相应抗体, 并分离纯化IgG。

3. K88、K99抗原效价的测定^[3,9,10]: 利用反向间接红血球凝集法将抗原按系列二倍稀释后进行效价测定。

4. 质粒在发酵过程中稳定性的测定: 发酵过程中不同时间取出发酵液用生理盐水适当稀释后以M₀培养基在琼脂糖凝胶平板上进行培养, 然后取出100个菌落分别点在二个M₀平板培养基上, 其中一个平板含50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨基青霉素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 分别统计细菌菌落数, 计算不含氨基青霉素抗性质粒的百分数。

5. 血液及初乳中K88、K99抗体的测定: 按洪孟民等^[9,11]人报道的制备致敏红血球方法制备致敏抗原红血球, 将免疫母猪血液及初乳按系列二倍稀释之后进行效价测定。

结 果

(一) K88、K99抗原蛋白的生产

用美国NBS自动控制发酵罐16L, 培养液体积为9—10L, 接种1/50体积的种子培养液, 发酵参数如表1所示, 搅拌速度开始时为500rpm左右, 随着细菌的生长, 需氧量增加, 搅拌速度提高至1000rpm左右, 通气量开始较低为9—12

表 1 发酵参数
Table 1 Parameters of the fermentation

时间 Time(h)	搅拌速度 Speed of agitation (rpm)	通气量 Airation (L/min)	溶氧 DO(%)	pH	压力 Pressure (kPa)	温度 ($^{\circ}\text{C}$)
0—4	500	9—12	78—45	6.5	48.3	37
4—10	600—900	12—18	25—30	6.5	48.3	37
10—22	1150	18	25—35	6.5	48.3	37

L/min逐渐增加到18L/min, 罐压为48.3kPa, 温度37 $^{\circ}\text{C}$, 过程中用氨水不断调节pH维持在6.5左右, 发酵时间为18—20h。图1结果表明在上述条件下菌体密度与通常条件下发酵相比提高8—10倍。体应该指出菌密度虽提高10倍, 而抗原蛋白K88、K99的产量却从一般发酵时的 2^{6-7} 水平提高到 2^{12} 水平。

(二) K88、K99抗原的分析

发酵过程中于不同时间取出发酵液以5000rpm离心将菌体与培养液分开, 分别用反向间接血球凝集法测定K88、K99抗原的效价, 如图2、3所示。随着细菌的生长K88、K99抗原效价的增长与细菌增殖同步进行, 图2、3结果表明细菌伞毛中的抗原效价与除去菌体后的培养液中的

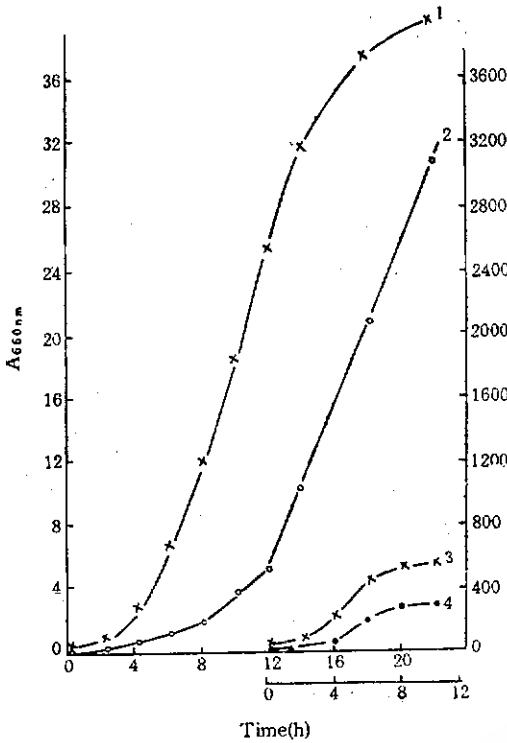


图 1 K88、K99基因工程菌在通常和高密度发酵条件下菌体生长与抗原表达

Fig. 1 Growth of bacteria and expression of antigens of K88, K99 at the conditions of high cell density fermentation and conventional fermentation

1. 在 高 密 度 发 酵 条 件 下 细 菌 的 生 长 Growth of bacteria at the condition of high cell density fermentation

2. 在 高 密 度 发 酵 条 件 下 K88、K99 抗 原 的 表 达 Expression of antigen of K88, K99 at the high cell density fermentation condition

3. 在 通 常 发 酵 条 件 下 细 菌 的 生 长 Growth of bacteria at the condition of conventional fermentation

4. 在 通 常 发 酵 条 件 下 K88、K99 抗 原 的 表 达 Expression of antigens at the condition of conventional fermentation

效价相同均都在 2^{12} 水平,说明工程菌在此发酵条件下 K88、K99 抗原除装配伞毛之外还有相当高的过量表达产物分布于发酵液中。进一步将离心除去菌体的发酵液经过超速离心 65000rpm 测定离心上清液中 K88, K99 抗原效价不变,说明培养液中的抗原不是以伞毛集合状态存在而是游离

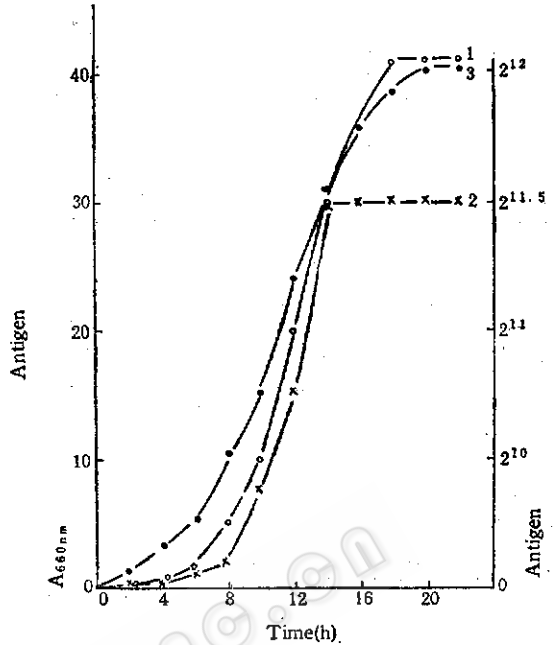


图 2 发酵过程中抗原 K88 在伞毛和培养液中的分布

Fig. 2 Location of the antigen of K88 in the pili of the bacteria and in the medium

1. 抗原 K88 在伞毛中的滴度 Titers of the antigen of K88 in the pili of the bacteria

2. 抗原 K88 在培养液中的滴度 Titers of the antigen of K88 in the medium

3. 细菌生长 Growth of the bacteria

抗原,这一结果表明 K88, K99 双价基因工程菌的表达与调控方式不同于野生型产肠毒素大肠杆菌,也不同于通常发酵条件下的抗原表达。在此高密度发酵和抗原过量表达条件下伞毛中的抗原和发酵液中游离存在的抗原可以完全回收制成疫苗,每 10L 发酵液可制备疫苗 10000 支,比相同条件下一般发酵时抗原产量提高 50 倍以上。

(三) 疫苗的制备

发酵液中的菌体及游离抗原经 0.4% 甲醛灭活处理 24h 后取样,在 M_0 培养基中培养检查证明无活菌存在后分装,每毫升含菌体 100 亿,灭活前抗原效价为 2^{12} 水平。分装后的疫苗经过冻干或低温冻结保

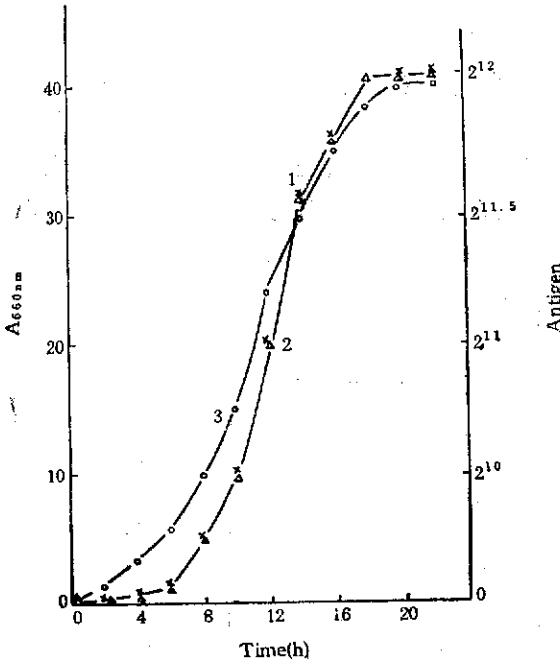


图 3 发酵过程中抗原 K99 在伞毛及发酵液中的分布

Fig. 3 Location of the antigen of K99 in the pili of the bacteria and in the medium

1. 抗原K99在伞毛中的滴度 Titers of antigen of K99 in the pili of the bacteria
2. 抗原K99在培养液中的滴度 Titers of the antigen of K99 in the medium
3. 细菌生长 Growth of the bacteria

存, 临用前加 2ml 兽用氢氧化铝佐剂, 混匀后注射。

(四) 质粒的稳定性

表 2 结果说明在发酵过程中含 K88、K99 抗原基因的表达型质粒随着发酵进程

表 2 质粒的稳定
Table 2 Stability of plasmid

时间 (h) Time (h)	区分数 (%)
0	100
2	97
6	86
10	78
14	72
20	69
22	70

表现有部分脱落倾向, 发酵 20h 后质粒的保存率在 70% 水平, 有时质粒的保存率可达 80—90% 以上对 K88、K99 双价基因工程疫苗的生产并无很大影响。

(五) 免疫怀孕母猪初乳中 K88、K99 抗体的消长

怀孕母猪产前 21 天左右注射 K88、K99 疫苗, 分娩后测定母猪初乳中的 K88、K99 抗体, 如表 3 结果, 不同母猪个体虽有差异

表 3 免疫母猪初乳中 K88、K99 抗体效价

Table 3 Antibody of K88, K99 presence in the colostrum of the immunized sow

天 数 Days	免疫母猪号 No. of the immunized sow					
	1	2	3	4	5	
K88	1	2 ⁷	2 ⁸	2 ^{8.5}	2 ⁶	2 ^{8.5}
	2	2 ⁵	2 ⁴	2 ^{4.5}	2	2 ^{1.5}
	3	2 ^{4.5}	2 ^{2.5}	2 ^{3.5}	2	2 ^{0.5}
K99	1	2 ¹⁴	2 ^{14.5}	2 ^{12.5}	2 ¹¹	2 ¹⁰
	2	2 ^{11.5}	2 ¹¹	2 ⁹	2 ⁹	2 ¹⁰
	3	2 ^{11.5}	2 ¹⁰	2 ⁸	2 ⁹	2 ^{8.5}

但初乳中都表现了 K88、K99 高效价抗体的存在, 初乳中的抗体效价的共同趋势是逐日迅速下降, 仔猪吮吸母乳, 其中的抗体则有效地阻止了产肠毒素大肠杆菌的感染。

(六) K88、K99 双价疫苗的安全性及有效性

以常规免疫剂量 (100 亿细菌/ml/每头母猪) 的 2—8 倍量免疫怀孕母猪, 皆无不良副作用, 另外按体重计算以常规免

疫母猪的剂量300—500倍注射小白鼠,以30—50倍剂量注射家兔观察一个月未发现不良反应。

用K88、K99 双价疫苗免疫的怀孕母猪,时间为预产期前21天,剂量为100亿细菌/ml/每头母猪,当母猪产仔后用野生型产肠毒素的大肠杆菌青3(100亿细菌/每

头仔猪)及Xul(200亿细菌/每头仔猪)给吸过母乳的一日龄仔猪攻毒,同时用未经免疫的母猪所生仔猪为对照进行同样的攻毒,免疫组仔猪表现了保护效果,对照组90%以上死亡。三年来在上海、江苏、浙江、湖南、福建、广东等地大量应用试验结果(表4)充分表现了疫苗的有效性。

表 4 野外试验
Fig. 4 Field test

年 Year	试验组 Group	怀孕母猪 Pregnant sow	仔猪 Piglets	感染仔猪 Infected piglets(%)	死亡率 Mortality (%)
1985	Immunized	1409	16264	1.78	0.18
	Control	26	247	78.5	50.2
1986	Immunized	627	7925	3.9	0.35
	Control	131	1307	42	8.5
1987	Immunized	5519	56564	1.68	0.4
	Control	345	4447	17	4

讨 论

虽然一些抗生素在一定程度上也能抑制致病性大肠杆菌的生长,但这些产肠毒素大肠杆菌会逐渐产生耐药抗性,致使黄痢腹泻更难控制导致危害的加剧。应用K88、K99疫苗将会使仔猪黄痢的危害逐年减少,是一条合理的控制幼畜腹泻的途径,况且疫苗价格低廉、使用方便、易于推广使用。关于基因工程的发酵生产K88、K99抗原疫苗也和其工程菌一样,工艺过程中会遇到质粒的稳定性,基因表达的调控、表达产物的稳定性、抗原的分离纯化、发酵过程的控制等一系列问题,本文工作

既有K88、K99疫苗生产的个性同时也具有某些基因工程菌的共性。

据初步核算,应用10L发酵液所得抗原量能生产10000支疫苗(100亿细菌/ml),相当于通常发酵时500L发酵液(即近1吨发酵罐的能力)由于高密度发酵体积小,能源消耗少,所占空间也小,因而能节省人力,设备和成本,我们认为利用几台这种小型发酵罐进行生产完全可以满足客观需要。

至于在本文所述发酵条件下,抗原基因的过量表达不仅装配于细菌表面的伞毛,而且有相当高浓度游离存在于发酵液中,其基因表达的调控机制是值得深入研究的。

参 考 文 献

- [1] Smith, H. W. and Linggood, M. A.: *J. Medical Microbiology*, 4: 467—485, 1971.
- [2] Gaastra, W. and Graff, De.: *Micobiological Reviews*, 46: 129—161, 1982.
- [3] Frits, K. and Graff, De. et al.: *Infection and Immunity*, 33: 877—883, 1980.
- [4] Frits, R. and Mooi, et al.: *Bact.*, 150: 512—521, 1982.
- [5] Van Emden, J. D. A. et al.: *Infection and Immunity*, 24: 1125—1133, 1980.
- [6] Shipley, P. L. et al.: *J. Bact.*, 145: 920—925, 1981.

- [7] Kehoe, M. et al.: FEBS Letters, 14: 129—132, 1982.
[8] Kehoe, M. et al.: Nature, 291: 122—126, 1981.
[9] 洪孟民等: 生物工程学报, 1(1): 36—45, 1985.
[10] 张景六等: 生物工程学报, 1(2): 34—40, 1986.
[11] 北京医学院微生物教研组: 实验免疫学, 人民卫生出版社, p.412, 1980.

TECHNOLOGY OF DIVALENT ENGINEERED DIARRHEA VACCINE PRODUCTION BY HIGH CELL DENSITY FERMENTATION AND THE ANTIGEN OVEREXPRESSION

Sun Yukun Gu Dainian Wu Aizhen Zhang Wenqin
Xu Anqing Jang Hobo Zhong Yiyi Zhang Zhian

(Shanghai Center of Biotechnology, Academia Sinica of Sciences, Shanghai)

This paper describes that the production of divalent K88, K99 antigens by high cell density fermentation and gene overexpression. The cell density reached above 40×10^8 cells/ml and the antigens was at 2^{12} level. Ten thousands dosage of the vaccine can be made by using 10L broth of the fermentation. The stability of the plasmid showed that about 30 percent of the bacteria lost its plasmid after 20h fermentation. It was found that the antigens were overexpressed and located in the pili of *E. coli* and in the medium in equal quantities. It means that the expression and regulation of the genes of K88, K99 may be different from the wild type of enterotoxigenic *E. coli*. Large number of the vaccinated pregnant sow showed that the piglets were effectively protected from the infection of enterotoxigenic *E. coli*. The results indicated that the large quantities requirement of the vaccine could be provided by using a small fermenter. This vaccine consists of two forms of the antigen K88, K99 which present in the pili as well medium is more favorable to stimulate the production of antibody in the pregnant sow.

Key words

K88, K99 vaccine; high cell density fermentation