

研究报告

基于响应面分析的高抗原活性猪水肿病大肠杆菌疫苗培养基的研制及效果评价

张阳阳^{#1,2}, 万强^{#3}, 牛得权², 苗森², 蒋富凤³, 刘翔², 曲晓莹³, 张菊梅², 蔡芷荷³, 陈博³, 吴清平^{*1,2}

1 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西 西安 710021

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东 广州 510070

3 广东环凯生物科技有限公司, 广东 肇庆 526238

张阳阳, 万强, 牛得权, 苗森, 蒋富凤, 刘翔, 曲晓莹, 张菊梅, 蔡芷荷, 陈博, 吴清平. 基于响应面分析的高抗原活性猪水肿病大肠杆菌疫苗培养基的研制及效果评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4141-4153.

ZHANG Yangyang, WAN Qiang, NIU Dequan, MIAO Sen, JIANG Fufeng, LIU Xiang, QU Xiaoying, ZHANG Jumei, CAI Zhihe, CHEN Bo, WU Qingping. Development and effect evaluation of a vaccine culture medium with high antigenic activity for the prevention of porcine edema disease caused by *Escherichia coli* based on response surface methodology[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4141-4153.

摘要: 【背景】猪水肿病大肠杆菌引发的疾病造成了很大的危害, 但现有培养基存在培养密度低的问题。【目的】研制出高抗原活性猪水肿病大肠杆菌疫苗培养基。【方法】以常用的市售猪水肿培养基为对照, 通过单因素试验、爬坡试验(Plackett-Burman, PB)、响应面(Box-Behnken, BB)试验对猪水肿培养基进行响应面优化, 得到猪水肿培养基最优配方。以响应面试验得到的培养基培养猪水肿病大肠杆菌, 评价不同培养时间点菌株的抗原活性, 制作灭活疫苗, 进行动物免疫保护试验。【结果】对研制的培养基进行扩大培养验证, 发现扩大培养得到的菌株活菌数可达 5×10^9 CFU/mL 以上, 约为对照组的 2 倍。制备的灭活疫苗效价可达 1:140 000, 并在 9 h 时抗原蛋白效价达到最高。【结论】本研究研制出的疫苗培养基显著提高了猪大肠杆菌菌体密度, 并可提高菌体抗原活性, 为猪水肿病灭活疫苗的制备提供了技术指引。

关键词: 猪水肿病; 响应面法; 疫苗培养基; 高抗原活性

资助项目: 国家自然科学基金(32072325); 广东省重点研发计划(2022B1111040002); 广东省科学院创新发展专项(2020GDASYL-20200103024)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072325), the Key Research and Development Program of Guangdong Province (2022B1111040002), and the Special Project for Innovation and Development of Guangdong Academy of Sciences (2020GDASYL-20200103024).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: wuqp203@163.com

Received: 2023-03-23; Accepted: 2023-05-26; Published online: 2023-07-03

Development and effect evaluation of a vaccine culture medium with high antigenic activity for the prevention of porcine edema disease caused by *Escherichia coli* based on response surface methodology

ZHANG Yangyang^{#1,2}, WAN Qiang^{#3}, NIU Dequan², MIAO Sen², JIANG Fufeng³, LIU Xiang², QU Xiaoying³, ZHANG Jumei², CAI Zhihe³, CHEN Bo³, WU Qingping^{*1,2}

1 College of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, Shaanxi, China

2 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

3 Guangdong Huankai Microbial Limited Company, Zhaoqing 526238, Guangdong, China

Abstract: [Background] Porcine edema disease caused by *Escherichia coli* is a major disease attacking pigs. The existing culture medium used for vaccine preparation has a low cell density. [Objective] To develop a vaccine culture medium with high antigenic activity for the prevention of porcine edema disease. [Methods] A commercially available vaccine culture medium against porcine edema disease was used as the control. The response surface methodology was employed to optimize the composition of the culture medium through single-factor experiments, Plackett-Burman (PB) design, and Box-Behnken (BB) design. The optimized culture medium was used to culture the *E. coli* eliciting porcine edema disease, and the antigenic activity of the culture at different time points was evaluated. In addition, the inactivated vaccine was prepared and used for animal immunization. [Results] The expanded culture of the pathogen in the developed culture medium showed that the viable cell count of the strain reached more than 5×10^9 CFU/mL, approximately twice that of the control group. Meanwhile, the titer of the inactivated vaccine reached 1:140 000, and the antigen protein titer peaked at the time point of 9 h. [Conclusion] The developed vaccine culture medium significantly improved the cell density and antigenic activity of *E. coli* causing porcine edema disease, providing technical guidance for preparing inactivated vaccines against porcine edema disease.

Keywords: porcine edema disease; response surface methodology; vaccine culture medium; high antigenic activity

大肠杆菌是一种兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌,大多作为共生细菌存在于人和温血动物的肠道中^[1]。部分大肠杆菌菌株含有毒力相关基因,使其具有致病性,严重威胁人和动物健康,

1885 年被首次报道,1893 年研究者对其致病菌与非致病菌进行了区分^[2-4]。本文所涉及猪大肠杆菌属于肠内致病菌,由此引发的疾病称为猪大肠杆菌病^[5-6]。猪大肠杆菌病有 4 种类型:仔猪

黄痢、仔猪白痢、断奶仔猪腹泻和猪水肿病, 其中猪水肿病因其高致死率受到广泛关注。

目前针对猪水肿病的预防手段多为使用抗生素或接种疫苗。病原菌的耐药性已成为全球日益严重的公共卫生问题, 同时在养殖环节中耐药病原菌造成的疫病对人类的食品安全构成了挑战^[7]。目前国内外针对猪大肠杆菌的疫苗研发方向主要有全菌灭活疫苗^[8]、基因工程疫苗^[9]、亚单位疫苗^[10]、弱毒疫苗^[11]、DNA 疫苗^[12]、菌影疫苗^[13]、植物载体疫苗^[14]和囊泡疫苗^[15]等, 其中全菌灭活疫苗因其成本低、制备方便和抗原成分全面等优点成为商品化猪大肠杆菌疫苗的主要选择。目前制作全菌灭活疫苗多采用活菌数最大时菌液, 但此时菌株抗原活性未必最高, 疫苗效果未达到最佳, 因此还需不断研究菌株的特性, 以期制备出经济效益高、免疫效果好的理想型疫苗。目前市场所用培养基多为胰酪大豆胨肉汤(tryptic soy broth, TSB)培养基, 存在生长时间长、培养菌量不高等不足, 此外还缺少免疫抗原的评价方法, 因此针对猪水肿病大肠杆菌高效培养基开发和抗原评价方法的探索势在必行。

本研究以猪水肿病大肠杆菌为研究对象, 通过单因素及响应面的试验设计方法研制新型培养基, 以期提高培养效率、降低生产成本, 为制备猪水肿病灭活疫苗提供有效帮助, 从而降低猪大肠杆菌对我国养猪业造成的损失。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用猪水肿病大肠杆菌(血清型: O139 型, 特征黏附素: F18ab)取自广东大华农动物保健品股份有限公司, 保存于广东环凯生物科技有限公司。

TSB 培养基、胰酪大豆胨琼脂(tryptic soy agar, TSA)培养基、促生长肽均购自广东环凯生

物科技有限公司; 培养基对照组, 国内 A 厂家的市售猪水肿培养基; 疫苗对照组, 国内 B 厂家的市售猪水肿灭活疫苗; TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)显色液、TMB 显色终止液, 上海碧云天生物技术有限公司; HRP (horseradish peroxidase)标记的羊抗鼠 IgG 抗体、脱脂奶粉, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

试验动物: 选择 4-6 周龄的 BALB/c 小鼠, 体重 18-25 g, 动物来源为广东斯嘉景达生物科技有限公司, 广东省科学院微生物研究所伦理委员会伦理编号: GT-IACUC202208101。

立式压力蒸汽灭菌器, HIRAYAMA 公司; 超净工作台, 北京东联科技有限公司; 电热恒温培养箱, 广东环凯微生物科技有限公司; 酶标仪, 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司; 雷磁数显 pH 计, 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备

将冷冻保存的猪水肿病大肠杆菌菌株从 -80 °C 冰箱中取出, 使用无菌接种环在 TSA 培养基上进行三区划线后放入 37 °C 恒温培养箱内培养 18 h, 挑取单菌落接种至新鲜无菌的 TSB 培养基中, 于 37 °C、150 r/min 条件下培养 12 h。将挑取单菌落培养 12 h 后的菌液以 2% (体积分数)的接种量转接至装有 TSB 培养基的三角瓶中, 于 37 °C、150 r/min 条件下培养 10-12 h 至 OD_{620} 值达到 1.2 左右制成种子液。

1.2.2 菌体密度测定

将种子液以 2% (体积分数)的接种量接种于自制培养基中, 于 37 °C、150 r/min 条件下培养 10 h, 每隔 1 h 取样一次, 利用酶标仪测定菌液的 OD_{620} 值, 并采用平板计数的方法测定活菌数。

1.2.3 单因素试验

按照菌株生长特性确定初始培养基组分: 促生长肽、酵母粉、牛肉浸粉、葡萄糖、磷酸氢二钾和氯化钠, 对初筛后的培养基组分以及生长

pH 进行单一变量试验, 各组分添加量分别为: (1) 促生长肽 7、8、9、10 和 11 g/L; (2) 酵母粉 3、4、5、6 和 7 g/L; (3) 牛肉浸粉 3、4、5、6 和 7 g/L; (4) 葡萄糖 3、4、5、6 和 7 g/L; (5) 磷酸氢二钾 1、2、3、4 和 5 g/L; (6) 氯化钠 5、8、10、12 和 15 g/L, pH 值为 6.6、6.8、7.0、7.2、7.4 和 7.6。使用酶标仪中速振荡模式下测生长曲线: 96 孔板中每孔加入 200 μ L 混匀菌液, 每种培养基 3 个平行; 37 $^{\circ}$ C 恒温培养, 每小时测一次 OD_{620} 值, 连续振荡培养 20 h 以上, 绘制不同条件下的细菌生长曲线。

1.2.4 Plackett-Burman 试验(PB 试验)

在单因素试验基础上, 以生长过程中菌液 OD_{620} 最大值为评价指标, 利用 Design-Expert 11 软件设计包括(A)促生长肽、(B)酵母粉、(C)牛肉浸粉、(D)葡萄糖、(E)磷酸氢二钾和(F)氯化钠等 6 种因素在内的六因素两水平试验, 筛选出 6 个变量中对猪大肠杆菌菌体密度具有显著影响的变量, 每组试验重复 3 次。PB 试验因素与水平见表 1。

1.2.5 最陡爬坡试验

根据 PB 试验选出对猪大肠杆菌菌体密度具有显著影响的 3 个变量, 依据其效应值确定变化方向及步长, 设计最陡爬坡试验, 平行试验 3 次, 确定响应面中心点。

1.2.6 Box-Behnken 试验(BB 试验)

依据 PB 试验和最陡爬坡试验结果, 以(A)

促生长肽、(B)酵母粉、(C)牛肉浸粉为变量因子, OD_{620} 最大值为响应值, 利用 Design-Expert 11 软件设计三因素三水平试验, 进行 3 次平行试验。试验设计及水平见表 2。

1.2.7 扩大培养验证

使用 10 L 培养容器分别对猪大肠杆菌疫苗培养基和对照 A 厂家培养基进行扩大培养, 培养体积为 5 L, 2% (体积分数)的接种量, 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下培养 13–15 h, 每隔 1–2 h 取样一次, 利用酶标仪测定菌液的 OD_{620} 值, 并采用稀释平板计数法测定活菌数, 试验重复 3 次。

1.2.8 不同生长阶段菌体抗原蛋白免疫活性的测定

用研制的猪水肿病疫苗培养基 37 $^{\circ}$ C 培养菌株, 取不同培养时间点(5、7、9、11、13 和 15 h)的菌液 6 000 r/min 离心 15 min, 菌体沉淀用 PBS (phosphate buffered saline)重悬后经超声破碎仪破碎 1 h (300 W, 工作 5 s, 间歇 10 s), 再经 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清蛋白, 将其稀释至同一浓度(5 μ g/L)后, 用猪大肠杆菌灭活疫苗免疫小鼠获得的血清作为一抗, 利用间接酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法测定培养过程中不同时间点的 IgG 抗体效价, 并以此评估不同时间点的抗原活性。

1.2.9 动物免疫保护实验

1) 佐剂制备: 取 7–10 号白油 470 mL, Span-80 30 mL, 硬脂酸铝 10 g, 混合后用力振荡, 116 $^{\circ}$ C 灭菌 30–40 min, 冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右, 再摇晃至透明均质状, 即为白油佐剂(油相)。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素及水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experimental design

Coding	Factor (g/L)	Level	
		-1	1
A	Growth peptide	10.0	12.0
B	Yeast powder	5.0	6.0
C	Beef extract	5.0	6.0
D	Glucose	4.0	4.8
E	Dipotassium phosphate	2.0	2.4
F	Sodium chloride	10.0	12.0

表 2 Box-Behnken 试验设计因素及水平

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken experimental design

Coding	Factor	Level		
		-1	0	1
A	Growth peptide (g/L)	12.0	13.0	14.0
B	Yeast powder (g/L)	6.0	6.5	7.0
C	Beef extract (g/L)	6.0	6.5	7.0

2) 疫苗制备: 利用新型猪水肿病疫苗培养基培养菌株, 分别取抗原活性最高和活菌数最大时的菌液加入 3% 甲醛灭活 28 h, 将灭活菌液与吐温-80 以 96:4 的比例混合作为水相。将水相和油相等比例混合, 用磁力搅拌器搅拌 1 h 即得到猪大肠杆菌灭活疫苗(佐剂、含菌量均与商品化猪水肿病灭活疫苗一致)。

3) 动物免疫: 选取 100 只小鼠, 随机分成 5 组(每组 20 只), 分别为活菌数最大灭活疫苗组、商品化灭活疫苗组、抗原活性最高灭活疫苗组、攻毒对照组和空白对照组。疫苗组每隔 14 d 进行一免, 每只小鼠皮下注射 200 μL 疫苗, 对照组仅注射等量生理盐水, 在免疫后第 14、28 天收集 3 只小鼠血清, 利用间接 ELISA 法检测血清抗体水平, 二免 14 d 后从各组剩余小鼠中随机挑选 10 只, 对疫苗组和攻毒组小鼠分别皮下注射 4 LD_{50} 活菌, 空白组依然注射等体积生理盐水, 观察并记录 7 d 内小鼠出现的临床症状和死亡情况。

1.2.10 间接 ELISA 检测方法

用抗原包被液稀释超声破碎裂解抗原液至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标板, 振摇 2 min, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后弃去包被液, 经 PBST (PBS+0.05%吐温-20) 洗涤(200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 清洗酶标板 3 次, 每次加入洗涤液后振摇酶标板 3 min, 弃液后拍干)后每孔加入 200 μL 封闭液(5 g 脱脂奶粉溶解于 100 mL PBS 中), 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h; 然后弃去封闭液, 洗涤酶标板, 每孔加入 100 μL 用

PBST 倍比稀释的待检小鼠血清(1:800、1 600、3 200、6 400、12 800、25 600、51 200、102 400、204 800 和 409 600), 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后弃液体, 洗涤酶标板后每孔加入 100 μL 1:3 000 稀释 (PBST 稀释) 的羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h, 然后弃液, 洗涤酶标板, 每孔加入 50 μL TMB 显色液, 室温避光静置 10–15 min 后每孔加入 50 μL 终止液以终止反应, 用酶标仪测量 OD_{490} 值, 若待检血清与阴性对照血清的比值大于 2, 判断为此时的稀释度接近待检血清的抗体效价。

1.2.11 不同培养基对猪水肿毒力因子表达的影响

1) 引物设计

根据 NCBI (National Coalition Building Institute) 提供的 F18abA 亚基信息, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 3)。

2) DNA 模板制备

在 TSA 和本研究研制培养基平板上进行划线, 分别挑取两平板单菌落于 100 μL 无菌水中, 沸水浴 10 min, 取出后置于冰上 5 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清作为后续 qPCR 模板备用。

3) qPCR 条件

qPCR 反应体系(10 μL): 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 0.5 μL , Super Mix (含 SYBR Green) 5 μL , 样品 DNA 1 μL , ddH₂O 3 μL 。qPCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

表 3 引物序列设计

Table 3 Primer sequence design

Coding	Gene name	Primer sequence (5'→3')	Length (bp)
1	FedA-F	GTGAAAAGACTAGTGTATTATTC	510
	FedA-R	CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC	
2	SLT-IIe-F	CCTTAATAAAAAGGAATATA	230
	SLT-IIe-R	CTGGTGGTGTATGATTAATA	
3	16S-F	GGAGGCAGCAGTGGGGAATA	1 062
	16S-R	TGACGGGCGGTGTGTACAAG	

1.2.12 培养基对不同黏附素大肠杆菌适应性

用本研究研制培养基按照 2% 接种量在 37 °C 恒温培养箱中培养从鸭体内分离所得大肠杆菌, 验证本研究研制培养基是否适用于其他黏附素大肠杆菌。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

按照 2% (体积分数) 的接种量进行单因素试

验, 结果如图 1 所示, 在 pH 值 7.4, 促生长肽、酵母粉、牛肉浸粉、葡萄糖、磷酸氢二钾和氯化钠添加量分别为 10、6、5、4、2 和 10 g/L 的条件下, 猪大肠杆菌菌体密度达到最高。

2.2 Plackett-Burman 试验结果

以单因素优化试验结果为基础, 使用 PB 试验确定对猪大肠杆菌培养菌密度提高具有显著作用的因子, 以每组试验生长 18 h 时 OD_{620} 作为响应值, 试验结果见表 4, 回归分析结果见表 5。

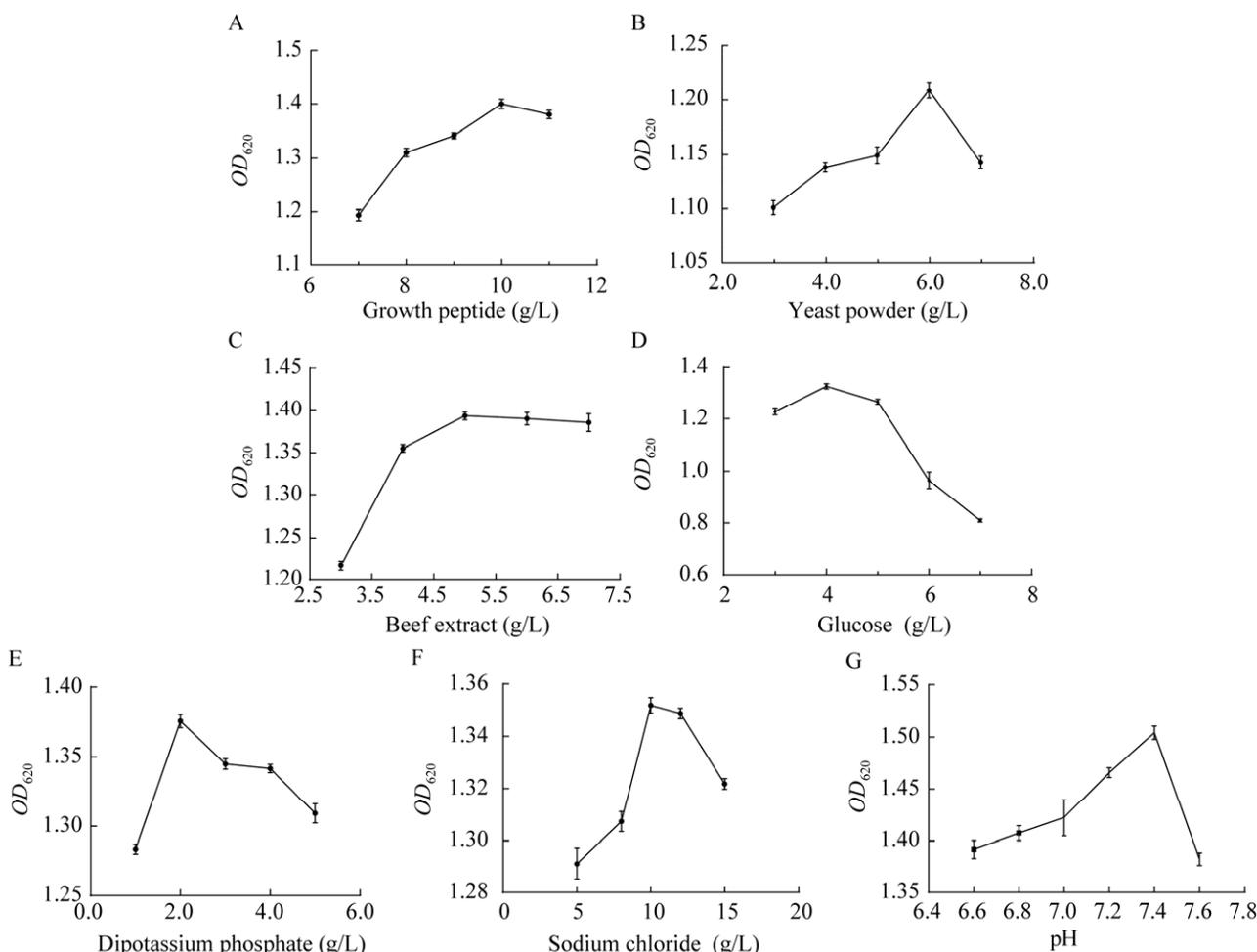


图 1 单因素试验结果 不同添加量的促生长肽(A)、酵母粉(B)、牛肉浸粉(C)、葡萄糖(D)、磷酸氢二钾(E)、氯化钠(F)和 pH(G)对猪大肠杆菌菌体密度的影响

Figure 1 Results of single factor test. Effects of growth peptide (A), yeast powder (B), beef extract (C), glucose (D), dipotassium phosphate (E), sodium chloride (F) and pH (G) with different doses on cell density of porcine *Escherichia coli*.

表 4 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 4 Design and results of Plackett-Burman experiments

Test No.	A	B	C	D	E	F	OD ₆₂₀
1	1	1	-1	-1	-1	1	1.458 9
2	-1	-1	1	-1	1	1	1.358 4
3	-1	1	1	-1	1	1	1.503 8
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.366 3
5	1	1	1	-1	-1	-1	1.537 1
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1.272 8
7	-1	1	-1	1	1	-1	1.338 3
8	1	-1	1	1	-1	1	1.396 1
9	1	-1	1	1	1	-1	1.415 5
10	-1	1	1	1	-1	-1	1.437 7
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1.349 9
12	1	1	-1	1	1	1	1.450 0

表 5 Plackett-Burman 试验回归分析结果

Table 5 Regression analysis results of Plackett-Burman experiments

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	P	Significant
Model	0.056 1	6	0.009 3	7.910 0	0.019 2	*
A	0.009 1	1	0.009 1	7.690 0	0.039 2	*
B	0.026 8	1	0.026 8	22.670 0	0.005 1	**
C	0.014 2	1	0.014 2	12.000 0	0.018 0	*
D	0.005 8	1	0.005 8	4.920 0	0.077 4	
E	0.000 2	1	0.000 2	0.198 2	0.674 8	
F	1.920×10 ⁻⁶	1	1.920×10 ⁻⁶	0.001 6	0.969 4	
Residual	0.005 9	5	0.001 2			
Cor total	0.062 0	11				

*: 差异显著($P<0.05$); **: 差异极显著($P<0.01$)

*: Significant difference at $P<0.05$; **: Significant difference at $P<0.01$.

各因素与 OD_{620} 值(Y)的一次回归方程为:
 $Y=1.41+0.027 5A+0.047 2B+0.034 4C-0.022 0D-0.004 4E-0.000 4F$, 该试验模型的 P 值为 0.019 2, 决定系数 $R^2=0.904 7$, 模型信噪比($adeq\ precision$)= $10.020 6>4$, 模型可用, 促生长肽(A)、牛肉浸粉(B)对猪大肠杆菌生长量的影响达到显著水平($P<0.05$), (C)酵母粉对猪大肠杆菌生长量的影响达到极显著水平($P<0.01$), 其他 3 个因素对大肠杆菌生长无显著性影响, 因此选择酵母粉、促生长肽和牛肉浸粉设计最陡爬坡试验, 其余因素在后续试验中保持单因素试验最佳水平。

2.3 最陡爬坡试验结果

采用最陡爬坡试验可快速确定最佳中心点, 根据上述回归试验确定最陡爬坡试验的 3 个因

素, 通过最陡爬坡试验的上升试验确定 3 个因素的最佳水平范围, 最陡爬坡试验设计及结果见表 6。由表 6 可知, 当促生长肽、酵母粉和牛肉浸粉的添加量分别为 13、6.5 和 6.5 g/L 时 OD_{620} 值最大, 作为响应面试验的中心点。

2.4 响应面试验优化设计

根据上述 PB 试验、最陡爬坡试验结果, 以 OD_{620} 值为响应值, 以促生长肽、酵母粉和牛肉浸粉为因素, 利用 Design-Expert 11 软件设计三因素三水平 BB 试验。BB 试验结果见表 7, 回归分析结果见表 8。通过方差分析和二次多项回归拟合, 得到 A、B、C 与 OD_{620} 值(Y)之间的多元二次回归方程:
 $Y=1.60+0.002 7A+0.011 4B-0.003 1C+0.001 7AB-0.015 9AC-0.010 1BC-0.074 0A^2-0.066 1B^2-0.081 3C^2$ 。

表 6 最陡爬坡试验设计与结果

Table 6 Design and results of the steepest climbing experiments

Coding	A	B	C	OD ₆₂₀
1	12	6.0	6.0	1.535 6
2	13	6.5	6.5	1.615 8
3	14	7.0	7.0	1.504 2
4	15	7.5	7.5	1.514 8
5	16	8.0	8.0	1.553 1
6	17	8.5	8.5	1.365 5

由表 8 可知, 该模型的 F 值为 558.55, P 值小于 0.01, 说明该模型极显著, 失拟项 F 值为 1.83, P 值为 0.281 2, 失拟项不显著, 模型的决定系数 $R^2=0.998 6$, 校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.996 8$, $R^2_{pred}=0.986 2$, 且 R^2_{Adj} 与 R^2_{pred} 差值小于 0.2, 模型信噪比(*adeq precision*)=56.061 6 大于 4, 变异系数 $C.V.=0.263 6\%$ 小于 10%, 说明该模型拟合度较高, 具有良好相关性, 模型可用。由表 8 中的 F 值可以判断对猪大肠杆菌生长量的影响因素主次顺序为 $B>C>A$, 其中对猪大肠杆菌生长量影响极显著的有一次项 A 、交互项 AC 以及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 , 对猪大肠杆菌生长量影响

表 8 回归方程方差分析

Table 8 Regression equation analysis of variance

Source of variance	Sum of squares	df	Mean square	F	P	Significance
Model	0.079 9	9	0.008 9	558.55	<0.000 1	**
A	0.000 1	1	0.000 1	3.72	0.095 1	**
B	0.001 0	1	0.001 0	65.38	<0.000 1	
C	0.000 1	1	0.000 1	4.70	0.066 8	
AB	0.000 0	1	0.000 0	0.684 9	0.435 2	
AC	0.001 0	1	0.001 0	63.30	<0.000 1	**
BC	0.000 4	1	0.000 4	25.79	0.001 4	**
A ²	0.023 0	1	0.023 0	1 448.19	<0.000 1	**
B ²	0.018 4	1	0.018 4	1 157.50	<0.000 1	**
C ²	0.027 8	1	0.027 8	1 750.36	<0.000 1	**
Residual	0.000 1	7	0.000 0			
Lack of fit	0.000 1	3	0.000 0	1.83	0.281 2	
Pure error	0.000 0	4	0.000 0			
Cor total	0.080 0	16				

$R^2=0.998 6$, $R^2_{Adj}=0.996 8$. *: 差异显著($P<0.05$); **: 差异极显著($P<0.01$)

$R^2=0.998 6$, $R^2_{Adj}=0.996 8$. *: Significant difference at $P<0.05$; **: Significant difference at $P<0.01$.

表 7 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 7 Design and results of Box-Behnken experiments

Coding	A	B	C	OD ₆₂₀
1	-1	0	1	1.473 9
2	0	0	0	1.619 8
3	0	1	1	1.463 5
4	1	0	-1	1.480 6
5	0	0	0	1.617 4
6	0	0	0	1.618 0
7	-1	0	-1	1.444 6
8	0	-1	1	1.465 2
9	-1	1	0	1.485 1
10	0	-1	-1	1.454 7
11	1	-1	0	1.464 7
12	1	1	0	1.495 0
13	0	0	0	1.617 6
14	-1	-1	0	1.461 4
15	1	0	1	1.446 4
16	0	0	0	1.610 8
17	0	1	-1	1.493 5

显著的有交互项 BC , 这说明各因素对猪大肠杆菌生长量的影响不呈线性关系。

2.5 响应面分析

不同因素之间的交互作用以响应面图和等高线图呈现, 见图 2。

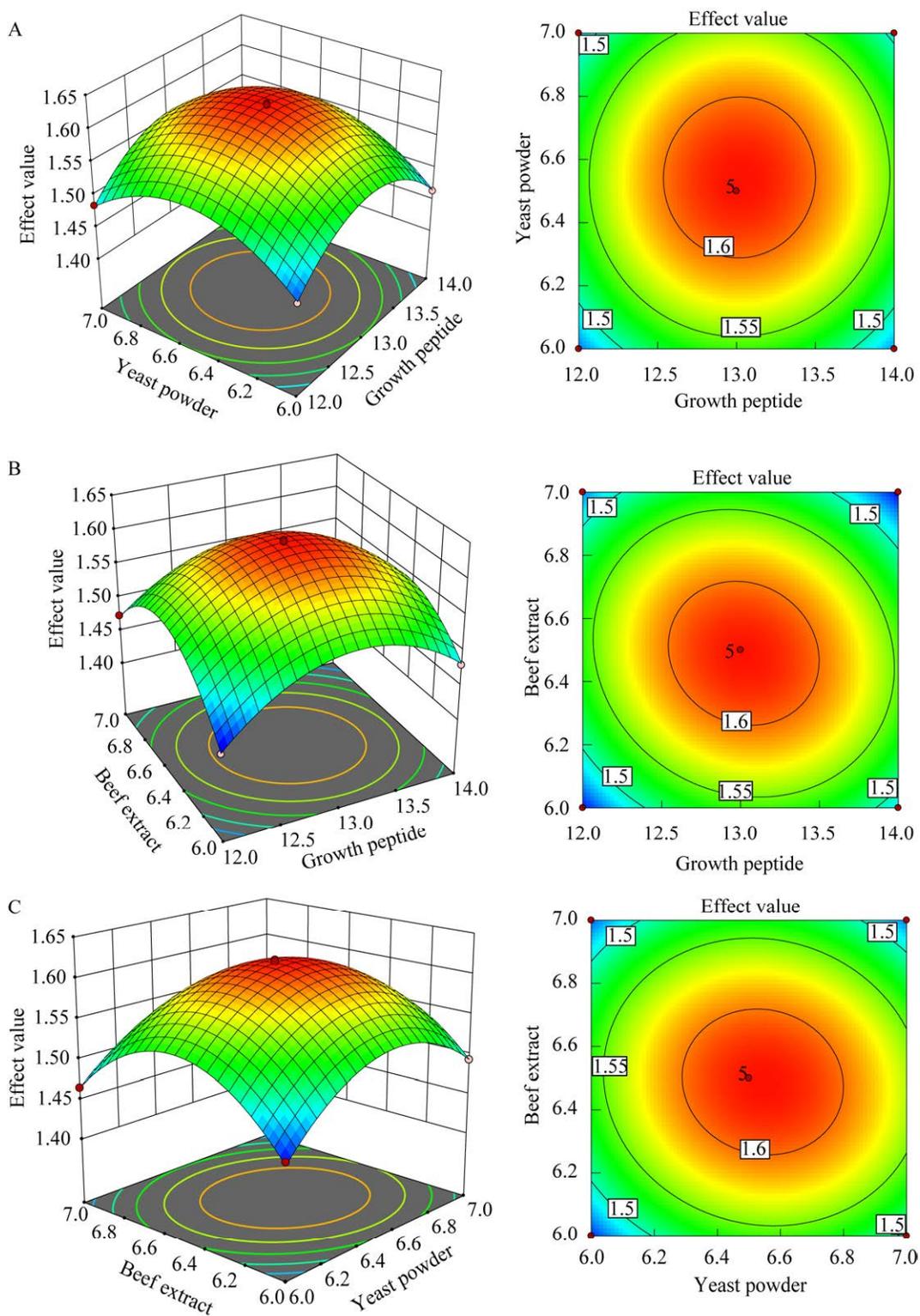


图 2 响应面图及等高线分析图 A: 促生长肽-酵母粉. B: 促生长肽-牛肉浸粉. C: 酵母粉-牛肉浸粉

Figure 2 Response surface diagram and contour analysis diagram. A: The growth peptide and yeast powder. B: The growth peptide and beef extract. C: Yeast powder and beef extract.

图 2 中等高线越接近圆形,说明两因子交互作用越不显著^[16]。由图 2A 可知,促生长肽和酵母粉的交互作用不显著($P>0.05$),当固定促生长肽添加量时, OD_{620} 值在酵母粉添加量为 6.0–6.5 g/L 时增大,在酵母粉添加量超过 6.5 g/L 时减小;由图 2B 可知,促生长肽和牛肉浸粉的交互作用极显著($P<0.01$),固定其中一个变量, OD_{620} 值与另外一个变量的增加先呈正相关后呈负相关;由 2C 可知,酵母粉和牛肉浸粉两组的交互作用极显著($P<0.01$),当酵母粉和牛肉浸粉添加量皆为 6.5 g/L 时, OD_{620} 值达到最大值。利用 Design-Expert 11 软件分析得出促生长肽、酵母粉、牛肉浸粉最佳添加量分别为 14.0、6.5 和 6.0 g/L。

2.6 扩大培养验证结果

利用 Design-Expert 11 分析得到理论最佳培养基为:促生长肽 14.0 g/L,酵母粉 6.5 g/L,牛肉浸粉 6.0 g/L,葡萄糖 4.0 g/L,磷酸氢二钾 2.0 g/L,氯化钠 10.0 g/L,预测 OD_{620} 最大为 1.539 0。用此培养基在温度 37 °C、初始 pH 值 7.4、通气量 4 L/min、接种量 2% (体积分数)的条件下进行培养验证,结果见图 3。利用此条件进行 3 次平行试验,用国内 A 厂家的市售猪水肿培养基在同样条件下作对照。3 次平行试验结果取平均值,发现响应面法优化培养基培养 OD_{620} 可达 1.604 8,国内 A 厂家的市售猪大肠杆菌培养基 OD_{620} 达

到 1.203 6,且在培养过程中检测 pH 变化,二者 pH 均持续下降;但自制培养基 pH 下降较对照组缓慢,且最终 pH 也高于对照组,证明培养基中存在比对照组优异的缓冲体系。培养过程中检测活菌数变化发现自制组比对照组菌体密度提高近 1 倍。响应面法优化培养基结果与预测值 1.539 0 相差很小,比对照组高 0.401 2,证明此次研发很成功,自制培养基与商品化培养基相比大大提高了生产效率,降低了生产成本,自制培养基可用。

2.7 毒力因子表达情况

F18ab 和 SLT-IIe 表达情况见图 4。由图 4 可知,以 TSB 培养基做对照进行 3 次独立重复试验,发现两种培养基对黏附素 F18ab 的表达无显著影响,对 SLT-IIe 的表达具有显著影响,且在自制培养基中 SLT-IIe 的表达量更高。

2.8 不同生长时间菌体抗原蛋白免疫原性测定结果

取猪大肠杆菌不同时间点菌液浓缩至同一浓度,经离心、破碎等操作后得到不同时间点抗原蛋白,取用二免后血清,测量菌体抗原蛋白效价,结果如图 5 所示。共取 6 个时间点抗原,分别为 5、7、9、11、13 和 15 h。发现在活菌数和 OD_{620} 值均不是最大值时抗原蛋白效价达到最高,即 9 h 抗原蛋白效价达到最高点,约 1:150 000。

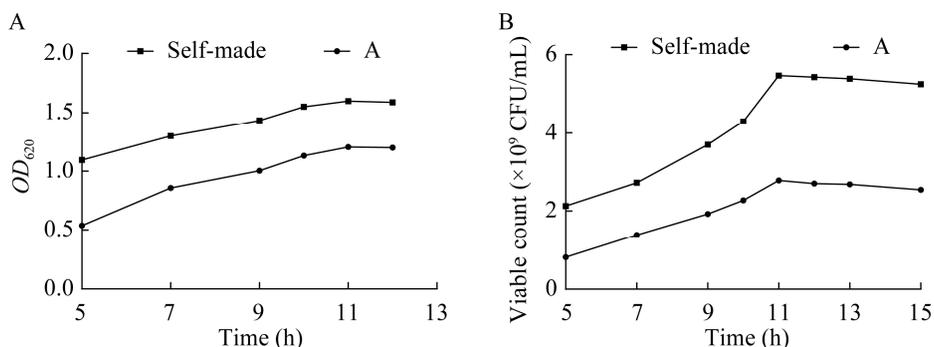


图 3 培养验证结果 A: OD_{620} , B: 活菌数

Figure 3 Culture verification results. A: OD_{620} . B: Viable count.

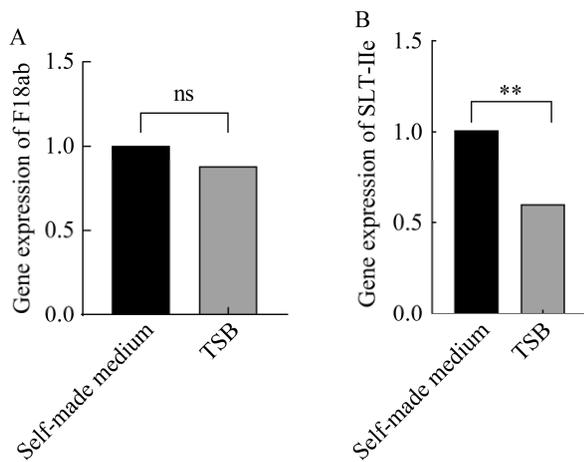


图4 特征毒力因子表达

Figure 4 Expression of characteristic virulence factors. A: F18ab. B: SLT-IIe. ns: Not significant; **: Significant difference at $P < 0.01$.

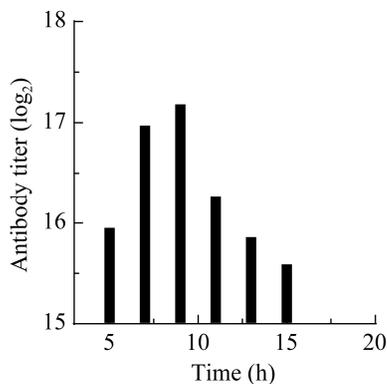


图5 猪大肠杆菌不同时间点菌体抗原蛋白效价
Figure 5 Titer of porcine *Escherichia coli* antigen protein at different timepoints.

2.9 小鼠实验结果

用响应面优化后培养基培养猪大肠杆菌, 采用和国内 B 厂家市售疫苗相同的制备方式制作全菌灭活疫苗注射小鼠, 分别在一免后两周、二免后两周取血, 提取血清, 用间接 ELISA 法测定血清抗体效价。同时对国内 B 厂家市售猪大肠杆菌全菌灭活疫苗进行同样操作做对照试验, 采集空白组小鼠各时间段血清作空白对照, 免疫原性结果如图 6 所示, 小鼠存活率如图 7 所示。抗原活性最高组一免和二免效价均高于活菌数

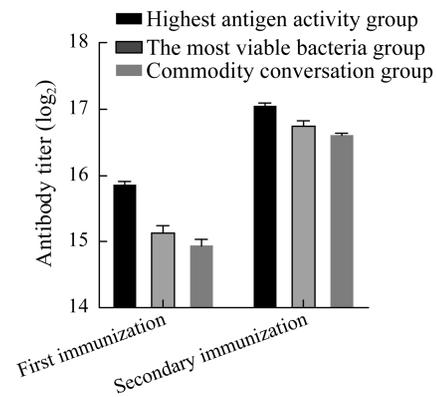


图6 免疫后小鼠血清中猪大肠杆菌抗体效价

Figure 6 Titers of porcine *Escherichia coli* antibodies in mouse serum after immunization.

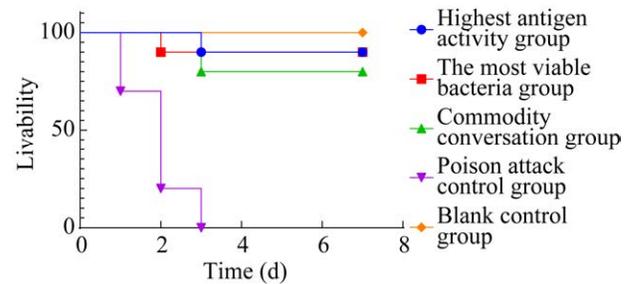


图7 免疫后小鼠存活情况

Figure 7 Survival of immunized mice.

最高组和商品化对照组。二次免疫后, 3 组抗体效价水平均有较大提高, 且经过二次免疫后抗原活性最高组抗体效价可达 1:140 000 以上, 活菌数最高组效价约 1:120 300, 商品对照组效价约 1:100 200。抗原活性最高组疫苗保护率可达 90%, 较另外两组疫苗也有较大优势。

2.10 培养基对不同黏附素大肠杆菌适应性结果

用本研究研制培养基培养自鸭体内分离得到的 2 株大肠杆菌, 培养结果见表 9。由表 9 可知, 培养 13 h 后验证用鸭大肠杆菌活菌数超过 1×10^{11} CFU/mL, 表明本研究所研制培养基也适用于含不同黏附素的大肠杆菌。

表9 鸭大肠杆菌计数结果

Table 9 Count results of duck *Escherichia coli*

Bacterial strain	Culture time	OD_{620}	Viable count (CFU/mL)
EC1	Seed liquid	1.270 1	1.05×10^{11}
	6 h	0.980 2	1.75×10^9
	9 h	1.163 5	8.17×10^9
	11 h	1.209 2	9.04×10^{10}
	13 h	1.261 3	1.72×10^{11}
	14 h	1.260 7	1.70×10^{11}
EC2	Seed liquid	1.231 4	9.31×10^{10}
	6 h	0.940 3	3.72×10^9
	9 h	1.109 6	9.13×10^9
	11 h	1.188 1	8.92×10^{10}
	13 h	1.228 9	1.33×10^{11}
	14 h	1.219 7	1.26×10^{11}

3 讨论与结论

相较于普通培养基,本研究所研制培养基在一定培养条件及培养体系下可培养获得更多活菌含量,由此制备的疫苗具备经济效益高、免疫效果好的特点。

本研究在单因素试验后,以此为基础进行 Plackett-Burman 试验,筛选出 3 个对猪大肠杆菌生长具有显著影响的因素。然后通过最陡爬坡试验快速确定响应面中心点范围。最后进行 Box-Behnken 试验得到理论最佳培养基配方:促生长肽 14 g/L,酵母粉 6.5 g/L,牛肉浸粉 6 g/L,葡萄糖 4 g/L,缓冲体系 2 g/L,氯化钠 10 g/L,最适生长 pH 值 7.4。此条件下 OD_{620} 可达到 1.604 8,活菌数最高可达 5.47×10^9 CFU/mL,相比国内 A 厂家的市售猪大肠杆菌培养基配方, OD_{620} 最高可达 1.203 6,活菌数最高可达 2.78×10^9 CFU/mL, OD_{620} 提高 0.401 2,活菌数提高近 1 倍,培养效果良好。经上述培养方法取得不同时间点培养菌液,破碎后得到不同时间点菌体抗原蛋白,利用上述小鼠实验血清测量不同生长时间菌体抗原蛋白免疫原性,发现在 9 h 附近抗原蛋白效价最

高。以 TSB 培养基为对照组,经 qPCR 检测发现,本研究所研制猪水肿疫苗培养基可显著提高 SLT-IIe 表达,但对 F18ab 表达无显著影响。

为证明本研究研制的培养基对猪大肠杆菌免疫原性确有提高作用,进行小鼠实验验证。利用本研究研制的猪大肠杆菌培养基培养菌液制作猪大肠杆菌全菌灭活疫苗,与国内 B 厂家市售同菌株同佐剂全菌灭活疫苗经小鼠实验比较,发现自制疫苗(抗原活性最高组)效价比 B 厂家疫苗组高。

综上所述,本研究研制的猪大肠杆菌培养基可在优化后的培养条件下培养得到更多的菌量,抗原活性佳,由此能够制备高抗原活性的疫苗,提高了疫苗的生产效率,为高抗原活性猪大肠杆菌疫苗的生产奠定基础。本研究在以下方面可进行进一步探究:本研究虽在基因水平评价了 F18ab 和 SLT-IIe 的转录表达,但因实验条件不足,未能在蛋白水平进行评价;另外,本研究所制疫苗在小鼠模型中取得了较好的效果,但因实验条件不足,未能进行猪模型的试验。

REFERENCES

- [1] BERNREITER-HOFER T, SCHWARZ L, MÜLLER E, CABAL-ROSEL A, KORUS M, MISIC D, FRANKENFELD K, ABRAHAM K, GRÜNZWEIL O, WEISS A, FEBLER AT, ALLERBERGER F, SCHWARZ S, SZOSTAK MP, RUPPITSCH W, LADINIG A, SPERGSE J, BRAUN SD, MONECKE S, EHRLICH R, et al. The pheno- and genotypic characterization of porcine *Escherichia coli* isolates[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1676.
- [2] ROBINS-BROWNE RM, HOLT KE, INGLE DJ, HOCKING DM, YANG J, TAUSCHEK M. Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing?[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016, 6: 141.
- [3] MAINIL J. *Escherichia coli* virulence factors[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 152(1/2): 2-12.
- [4] KOCH R. An address on cholera and its *Bacillus*[J].

- British Medical Journal, 1884, 2(1235): 403-407.
- [5] HERMANN-BANK ML, SKOVGAARD K, STOCKMARR A, STRUBE ML, LARSEN N, KONGSTED H, INGERSLEV HC, MØLBAK L, BOYE M. Characterization of the bacterial gut microbiota of piglets suffering from new neonatal porcine diarrhoea[J]. BMC Veterinary Research, 2015, 11(1): 139.
- [6] YAKIMOVA EA, MATYASH EA, BELYAEVA AS, KAPUSTIN AV, LAISHEVTSEV AI. Etiological structure of pig colibacillosis on the territory of the Russian Federation[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 848(1): 012225.
- [7] 刘琳, 郭晓银, 何彦侠, 张阳, 吴保庆, 于文会, 田浪. 腹泻仔猪肠道大肠杆菌分离鉴定与毒力基因及耐药性分析[J]. 东北农业大学学报, 2022, 53(6): 65-75.
- LIU L, GUO XY, HE YX, ZHANG Y, WU BQ, YU WH, TIAN L. Identification, virulence gene and antibiotic resistance analysis of *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2022, 53(6): 65-75 (in Chinese).
- [8] 王保宁, 贡嘎, 王刚, 黄筱均, 张璇, 强巴央宗, 索朗斯珠. 藏仔猪致病性大肠杆菌疫苗的制备及效果评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(1): 73-78.
- WANG BN, GONG G, WANG G, HUANG XJ, ZHANG X, QIANGBA YZ, SUOLANG SZ. Preparation and effect evaluation of the adjuvant vaccine of enteropathogenic *Escherichia coli* in Tibetan piglets[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2018, 34(1): 73-78 (in Chinese).
- [9] 陈章水, 崔益洙, 郭宝清, 孔令达. 新生猪腹泻大肠杆菌 K_(88)K_(99)双价基因工程疫苗穴位接种免疫试验[J]. 中国农业科学, 1995, 28(1): 75-79.
- CHEN ZS, CUI YZ, GUO BQ, KONG LD. Newborn pig diarrhea *Escherichia coli* K_(88) K_(99) double valent genetic engineering vaccine acupoint immunization test[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1995, 28(1): 75-79 (in Chinese).
- [10] 袁万哲, 何孔旺, 陆承平. 仔猪大肠杆菌病 K88-K99-987P-F41 四价亚单位疫苗的研制 IV. 疫苗生产与免疫效力试验[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(6): 818-820, 861.
- YUAN WZ, HE KW, LU CP. Development of K88-K99-987P-F41 tetravalent subunit vaccine against piglet colibacillosis IV. vaccine production and immunization efficacy experiment[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2007, 27(6): 818-820, 861 (in Chinese).
- [11] 冯启峰, 侯美佳, 孙思萌, 石博, 刘嘉利, 董秀梅, 张萍, 师东方. 产不耐热肠毒素大肠杆菌减毒突变菌株的毒性和免疫应答评价[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(3): 310-318.
- FENG QZ, HOU MJ, SUN SM, SHI B, LIU JL, DONG XM, ZHANG P, SHI DF. Evaluation of the toxicity and immune response of the attenuated mutant strains of heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021, 43(3): 310-318 (in Chinese).
- [12] 王劫. 产肠毒素大肠杆菌菌毛的 DNA 疫苗研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(2): 178-181.
- WANG J. The review of DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) fimbriae[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(2): 178-181 (in Chinese).
- [13] HUTER V, SZOSTAK MP, GAMPFER J, PRETHALER S, WANNER G, GABOR F, LUBITZ W. Bacterial ghosts as drug carrier and targeting vehicles[J]. Journal of Controlled Release, 1999, 61(1/2): 51-63.
- [14] YUSIBOV V, RABINDRAN S, COMMANDEUR U, TWYMAN RM, FISCHER R. The potential of plant virus vectors for vaccine production[J]. Drugs in R & D, 2006, 7(4): 203-217.
- [15] HU RJ, LI J, ZHAO YZ, LIN H, LIANG L, WANG MM, LIU HJ, MIN YN, GAO YP, YANG MM. Exploiting bacterial outer membrane vesicles as a cross-protective vaccine candidate against avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 1-17.
- [16] JHA P, DAS AJ, DEKA SC. Optimisation of fermentation process for production of black rice wine and evaluation of its phenolic and volatile compounds[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2018, 124(4): 485-491.