

文章编号: 1001-411X(2002)01-0067-04

禽巴氏杆菌大肠杆菌融合二联弱毒菌株 F₄ 的培育

吴孔兴¹, 黄青云², 丘家军³

(1 广东温氏食品集团, 广东 新兴 527439; 2 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 3 广东正大康地有限公司, 广东 广州 510000)

摘要: 以恩诺沙星标记禽多杀性巴氏杆菌强毒株 C₄₈₋₁ 得到的耐药菌株 C₄₈₋₁(Enr^r, Chl^s), 与禽大肠杆菌 O₇₈ 弱毒株 O₇₈(Chl^r, Enr^s) 作为亲本菌株, 采用溶菌酶-EDTA 法制备两亲本菌株原生质体, 通过聚乙二醇(PEG)-新生磷酸钙促融系统进行两亲本菌株原生质体融合, 得到 16 株双耐药融合菌株. 选取融合菌株 F₄、F₉ 进行初步的免疫试验, 初步显示融合菌株 F₄ 是一株安全、具双联免疫效果的融合菌株.

关键词: 禽多杀性巴氏杆菌; 禽大肠杆菌; 原生质体融合
中图分类号: S852.612 **文献标识码:** A

原生质体融合技术是 20 世纪 70 年代发展起来的微生物遗传育种技术, 此项技术正处于不断创新和发展. 在细菌原生质体融合过程中由于革兰氏阴性菌细胞壁的化学组成较革兰氏阳性菌复杂, 增加了革兰氏阴性菌融合的难度. 革兰氏阴性菌科间原生质体融合受染色体 DNA 同源性所限, 至今国内外融合成功的报道更少.

禽多杀性巴氏杆菌引起的禽霍乱和禽大肠杆菌引起的禽大肠杆菌病是危害养禽业的两大细菌性传染病. 目前针对这两种病的预防主要靠抗菌药物和灭活疫苗或亚单位疫苗免疫. 鉴于抗菌药物与灭活疫苗、亚单位疫苗存在的局限和不足之处, 有必要研制出一种高效、安全、适合于规模化养殖的双联弱毒疫苗.

蒋文泓等^[1]进行了禽巴氏杆菌大肠杆菌原生质体融合研究, 成功获得了双耐药的融合子, 虽经后来免疫试验筛选, 未能获得表达双联免疫原性的融合菌株, 但在开展革兰氏阴性菌科间原生质体融合方面迈开了可喜的一步, 为进一步研究培育二联弱毒菌株提供了基础. 本试验改进了原生质体融合及融合子筛选的条件, 再进行禽巴氏杆菌大肠杆菌的融合, 从 16 个融合菌株中初步筛选到 F₄ 株为安全、具双联免疫效果的融合菌株.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

禽大肠杆菌 O₇₈ 强毒株(简称 O₇₈)和多杀性巴氏杆菌 C₄₈₋₁ 强毒株(简称 C₄₈₋₁), 由中国兽药监察所提供; 氯霉素(30 μg/mL)标记的禽大肠杆菌 O₇₈, 简称 O₇₈(Chl^r, Enr^s)由黄青云等培育.

1.2 主要细菌培养基

营养肉汤、麦康凯琼脂、马丁肉汤、高渗马丁肉

汤; 马丁肉汤+蔗糖(0.3 mol/L)+丁二酸钠(0.2 mol/L)+氯化镁(0.02 mol/L)+顺丁烯二酸(0.02 mol/L)+PEG 4 000(1 g/L)+聚乙烯吡咯烷酮(15 g/L)、高渗马丁平板、马丁琼脂平板、微量生化鉴定培养管等.

1.3 用于原生质体制备和融合的主要溶液及缓冲液

溶菌酶、Tris 缓冲液: 0.01 mol/L Tris·HCl, pH 8.0, 高渗 Tris 缓冲液: Tris 缓冲液加入蔗糖 0.3 mol/L、丁二酸钠 0.2 mol/L 及氯化钙 0.01 mol/L, 高渗 TrisPNB 缓冲液: 高渗 Tris 缓冲液加入 15 g/L 聚乙烯吡咯烷酮和 22 g/L 营养肉汤粉, SMM 缓冲液: 蔗糖 0.3 mol/L、丁二酸钠 0.2 mol/L、氯化镁 0.02 mol/L、顺丁烯二酸 0.02 mol/L, SMMNB 缓冲液: SMM 缓冲液加入 22 g/L 营养肉汤粉, SMMNBC 缓冲液: SMMNB 缓冲液加入氯化钙 0.01 mol/L, EDTA 缓冲液: 0.1 mol/L EDTA、pH8.0, PEG 液: PEG4 000, 400 g/L(用 SMMNBC 缓冲液配制).

1.4 供试动物

从华南农业大学实验鸡场购得 1 d 龄粤黄鸡 100 只, 严格条件下养至 20~40 d 龄供 O₇₈、C₄₈₋₁ 标准强毒的测毒、F₄、F₉ 的免疫、攻毒等试验.

1.5 方法

1.5.1 O₇₈ 耐药菌株的稳定 采用逐渐提高药物浓度诱导培养法, 将已耐药的菌株 O₇₈(Chl^r, Enr^s) 在含氯霉素的马丁肉汤中培养, 使其耐药性稳定在 30 μg/mL.

1.5.2 C₄₈₋₁ 耐药菌株的培养及稳定 以试管二倍稀释法测得恩诺沙星对 C₄₈₋₁ 的最小抑菌浓度(MIC), 以 1/2MIC 浓度为起点逐级提高药物浓度, 最终得到最大耐药浓度为 10 μg/mL 的稳定耐药菌株

收稿日期: 2001-08-21

作者简介: 吴孔兴(1973-), 男, 硕士.

通讯作者: 黄青云(1946-), 男, 教授.

基金项目: 广东省自然科学基金项目(960445)

$C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$.

1.5.3 菌株 $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 和 $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 生长曲线测定 用 752 紫外分光光度计测定 37°C 不同培养时间的两亲本菌株, 测量波长在 600 nm 时在含药马丁肉汤中的透光率 ($T/\%$), 以绘制生长曲线图。

1.5.4 菌株 $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 和 $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 原生质体的制备 分别参照蒋文泓等^[1] 和黄青云等^[2] 介绍的方法制备 $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 和 $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 原生质体. 原生质体形成率和再生率按江行鹄等^[3] 介绍的方法进行测定和计算。

1.5.5 菌株 $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 和 $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 原生质体的融合 参照蒋文泓等^[1] 和刘伊强等^[4] 报道的方法进行, 即取两亲本原生质体悬浮液各 4 mL 充分混合, 3 500 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 加入 1.8 mL 400 kg/L PEG 4 000 溶液和 0.2 mL 新生磷酸钙溶液, 混合均匀, 37°C 保温 20 min, 用 SMMNBC 缓冲液稀释 10 倍, 取 0.1 mL 接种含 Enr $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 Chl $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 高渗马丁肉汤, 37°C 培养 48 h, 观察生长情况. 同时设置对照: 将 $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 和 $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 原生质体悬浮液分别用 SMMNBC 缓冲液作 10 倍稀释, 各取 0.1 mL 分别接进含恩诺沙星 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的高渗马丁肉汤、含氯霉素 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的高渗马丁肉汤、含有恩诺沙星 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、氯霉素 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的高渗马丁肉汤中 37°C 培养 48 h, 观察生长情况。

1.5.6 融合菌株的选出及微量生化试验 从含恩诺沙星 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、氯霉素 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的马丁肉汤培养物中取 0.1 mL 接入含恩诺沙星 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、氯霉素 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的马丁平板, 37°C 培养 24 h; 挑取单菌落, 分别记为 $F_1 \sim F_{16}$. 对此 16 株融合子进行微量生化试验。

1.5.7 融合菌株 F_4 和 F_9 安全性和双联免疫保护效果的初步试验 选取生化特性与双亲本株差异较大的融合菌株 F_4 , 差异较小的融合株 F_9 , 用 40 d 龄粤黄鸡各 15 只, 分别肌注 F_4 或 F_9 的马丁肉汤 24 h 培养物, 1.4×10^9 CFU/只, 观察到 18 d, 均进行最小致死

量 O_{78} 标准强毒 (1.4×10^8 CFU/只) + 最小致死量 C_{48-1} 标准强毒菌 (40 CFU/只) 混合肌注, 观察 7 d, 记录死亡鸡数, 存活鸡数, 同时设非免疫攻毒对照及空白对照鸡各 15 只, 筛选具有双联免疫保护效果的融合菌株。

2 结果

2.1 两亲本菌株在马丁肉汤中的生长曲线

如图 1 所示, $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 和 $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 的对数生长期分别为 3~7 h 和 1~4.5 h。

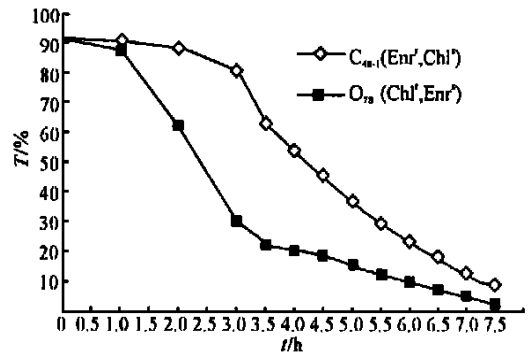


图 1 $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 、 $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 的生长曲线

Fig. 1 Growth Curves of $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ and $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$

2.2 两亲本菌株 $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 和 $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 原生质体形成率和再生率

根据在高渗马丁平板、马丁营养琼脂平板上生长的菌落数, 计算结果如下: $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 原生质体形成率 = 80%, $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 原生质体再生率 = 79%, $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 原生质体形成率 = 72.6%, $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 原生质体再生率 = 72.9%。

2.3 亲本菌株原生质体融合、筛选

两亲本菌株原生质体融合后培养结果见表 1。

表 1 表明, 在含 Enr 和 Chl 的高渗培养基中生长的细菌是融合成功的双耐药融合子。

2.4 融合菌株 $F_1 \sim F_{16}$ 的微量生化试验结果

融合子 $F_1 \sim F_{16}$ 的微量生化试验结果见表 2。

表 1 耐药菌株 C_{48-1} 和 O_{78} 原生质体融合结果

Tab. 1 Results of spheroplast fusion of *Escherichia coli* $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ and *Pasteurella multocida* $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$

菌株 spheroplasts of different strains	高渗马丁肉汤 Hyper-osmotic Martine Broth ¹⁾		
	$Chl(30 \mu\text{g}/\text{mL})$	$Enr(10 \mu\text{g}/\text{mL})$	$Chl(30 \mu\text{g}/\text{mL}) + Enr(10 \mu\text{g}/\text{mL})$
$O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 原生质体 spheroplasts of $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$	+	-	-
$C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 原生质体 spheroplasts of $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$	-	+	-
$O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ 和 $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$ 原生质体融合子 fused spheroplasts of $O_{78}(Chl^r, Enr^s)$ and $C_{48-1}(Enr^r, Chl^s)$	+	+	+

1) “+”表示生长,“-”表示不生长

表 2 融合子 F₁~F₁₆的微量生化试验结果¹⁾

Tab. 2 Microbiochemical tests of fusion strains (F₁ ~ F₁₆)

菌株 strain	葡萄糖 glucose	乳糖 lactose	麦芽糖 maltose	甘露糖 mannitol	蔗糖 sucrose	靛基质 indole	V-P	枸橼酸盐 citrate	H ₂ S	尿素 urea
O ₇₈	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C ₄₈₋₁	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
F ₁	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₂	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₃	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
F ₄	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
F ₅	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₆	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
F ₇	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
F ₈	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₉	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₁₀	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₁₁	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₁₂	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
F ₁₃	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₁₄	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₁₅	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
F ₁₆	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+

1)“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应

表 2 显示, F₄ 的生化性状较特别, 其余各株基本相似, 故选 F₄ 和其余的随机代表株 F₉ 进行安全性及双联免疫保护效果的初步筛选试验。

2.5 融合菌株 F₄ 和 F₉ 的安全性和双联免疫保护效果的初步筛选试验结果

40 d 龄的 F₄ 组、F₉ 组粤黄鸡分别肌注 F₄(1.4 × 10⁹ CFU/只)、F₉(1.4 × 10⁹ CFU/只)37 °C 24 h 的马丁肉汤培养物后, 观察 18 d, 全部试验鸡因当时气温高(33 °C)及注射应激, 在注射当天及第 2 d 精神较差、食欲减少, 第 3 d 天即恢复正常, 表明安全性良好。免疫攻毒保护情况见表 3。

表 3 融合菌株 F₄、F₉ 免疫保护初步试验结果

Tab. 3 The preliminary immunological tests of 2 fusion attenuated strains (F₄ and F₉)

组别 groups	试验鸡只 number of testing chicks	死亡数 number of morbidity	存活数 number of living	健康存活率 rate of living / %
F ₄	15	2	13	86.7
F ₉	15	10	5	33.3
非免疫对照组 non-vaccinated	15	8	7	46.7
空白对照组 control group	10	0	10	100

表 3 数据显示: F₉ 株没有双联免疫效果, F₉ 组的健康存活率比非免疫对照组低, 但统计差异不显著 (P

> 0.05)。F₄ 组与非免疫对照组的健康存活率差异显著 (P < 0.05) 初步表明 F₄ 具有明显的双联免疫效果。

3 讨论

3.1 亲本菌株的选择和标记

蒋文泓等^[1]选用以氯霉素 (Chl) 标记的华农系禽巴氏杆菌弱毒株 (5: A) (Chl^r、Nor^s) 和以诺氟沙星标记的禽大肠杆菌 O₂ (Nor^r、Chl^r) 为亲本, 进行原生质体融合, 虽然获得了双耐药的融合子, 但经免疫试验未筛选到表达良好双联免疫原性的融合子。分析其原因, 可能是华农系禽巴氏杆菌弱毒株 (5: A) 的免疫原性已很弱, 经过 Chl 诱导成耐药菌株后, 免疫原性更弱, 故改用免疫原性原本的禽巴氏杆菌标准强毒菌株 C₄₈₋₁, 以恩诺沙星标记。另一亲本菌株也相应改用免疫原性优良的氯霉素标记的禽大肠杆菌 O₇₈ (Chl^r、Enr^s) 菌株^[5], 进行原生质体融合, 结果获得 16 株耐 Enr 和 Chl 的融合菌。经较全面微量生化试验, 筛选出生化性状较特异的菌株 F₄, 及生化性状较共同的代表菌株 F₉, 进行粤黄鸡的免疫、攻毒保护试验, 结果显示 F₄、F₉ 菌对鸡的安全性均良好, 但 F₉ 菌无免疫保护作用; F₄ 菌具有明显的双联免疫保护效果。但这只是初步的免疫筛选试验, 对融合菌株 F₄ 的安全性、稳定性及双联免疫原性有待系统进行试验评价。

3.2 原生质体融合后融合子的再生与拣出

其常规方法有两种: 一是直接法, 即先将融合液

涂布于含两种标记药物的高渗再生平板上,直接培养出双耐药的融合菌株。二是间接法。就是取融合菌液涂布于无药高渗再生平板上,让双亲本菌株和融合子均再生长出菌落,然后用影印法转印到含两种标记药物的普通营养平板上,培养出融合菌株。以此为基础改进的方法有双层软琼脂法^[6]。本研究经反复试验改进为肉汤—平板法;即是将融合菌液先接进含两种标记药物的高渗马丁肉汤中,生长后再转移到普通马丁平板上培养,结果容易得到融合菌株。经分析,此法的优点在于含双标记药物的高渗马丁肉汤中含药浓度及含细胞壁再生的营养成分的浓度和pH值等都维持准确稳定(平板易在37℃培养过程中水分蒸发而改变),故有利于融合子的再生及拣出。

参考文献:

[1] 蒋文泓,黄青云. 禽多杀性巴氏杆菌与大肠杆菌原生质

体融合的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1999, 30(3): 267—272.

[2] 黄青云,任涛. 禽大肠杆菌O₂与O₇₈弱毒菌株原生质体融合的研究[A]. 中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会第十届全国会员代表大会暨学术年会论文集(兽医卷)[C]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996. 188—192.

[3] 江行鹂,杨庆云. 枯草杆菌中通过细胞融合的质粒转移[J]. 遗传学报, 1981, (1): 1—7.

[4] 刘伊强,王雅平. 芽孢杆菌原生质体的形成、再生及种间融合的研究[J]. 微生物学报, 1994, 34(1): 76—80.

[5] 刘熙文,黄青云. 禽大肠杆菌融合四种双价弱毒菌苗免疫原性的研究[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25(3): 12—14.

[6] 薛青,盛祖嘉. 枯草杆菌和大肠杆菌间通过原生质体融合的质粒PHV33的转移[J]. 遗传学报, 1983, 10(2): 91—95.

Development of 2—Combined Attenuated Strain F₄ by Fusing *Escherichia coli*.O₇₈ with *Pasteurella multocida* C₄₈₋₁

WU Kong-xing¹, HUANG Qing-yun², QIU Jia-jun³

(1 Guangdong Wen's Foodstuff Group Ltd., Xinxing 527439, China; 2 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 3 Guangdong Zhergda Kangdi Ltd., Guangzhou 510000, China)

Abstract: This paper deals mainly with the interfamily spheroplast fusion of *Pasteurella multocida* C₄₈₋₁ (Enr^r, Chl^f) and *Escherichia coli* O₇₈ (Chl^r, Enr^s), and the development of 2—combined attenuated strains. Protoplast fusion was performed by mixing protoplast suspension with 400 g/L PEG4 000 and newly formed Ca₃(PO₄)₂, and 16 strains hybrid cells with two drug—resistant markers were selected. To test the immunogenicity and safety of 2 fusion attenuated strains (F₄ and F₉), Guangdong yellow chicks were vaccinated separately with F₄ and F₉. The result showed that the F₄ strain was safe and with immunogenicity attributable to the two parent bacteria.

Key words: *Pasteurella multocida*; *Escherichia coli*.; protoplast fusion

【责任编辑 柴焰】