

· 成果简介 ·

幼畜大肠菌腹泻基因工程多价疫苗

陈添弥 黄翠芬*

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

[关键词] 基因工程疫苗, 肠毒素性大肠杆菌, 预防仔猪腹泻, 预防犊牛羔羊腹泻

我国是畜牧业大国, 猪、牛、羊等是主要经济家畜。腹泻是影响畜牧业发展的重要疫病, 因肠毒素性大肠杆菌引起的新生幼畜腹泻发病率高达 30%—80%, 死亡率达 10%—30%, 严重影响幼畜的成活和发育, 每年要为此蒙受巨大的经济损失。幼畜腹泻的药物治疗不但价格昂贵、费力费工, 而且效果不好; 更因致病菌抗药菌株日趋增多, 用药往往无效, 因而免疫预防是最佳选择。

预防新生幼畜的疾病必须采用免疫孕母畜的办法。但国内外曾采用的灭活疫苗或自场活疫苗等, 由于副作用严重, 效果也不理想, 未能推广使用。基因工程手段的问世, 以其能得到特定基因, 去除毒副作用基因, 进行多个基因组合, 以及可提高目的基因表达量等方面在构建疫苗菌株上具有的优越性, 为新型安全、高效疫苗的研制提供了条件。自 1982 年以来, 军事医学科学院生物工程研究所先后有几十人参加了幼畜大肠菌腹泻基因工程疫苗的研究, 包括预防仔猪与预防犊牛羔羊腹泻的两种疫苗。

大肠菌腹泻的致病因子主要是粘附素和肠毒素。粘附素本身虽是无毒的, 但致病菌藉助于粘附素粘附于宿主小肠上皮细胞上, 定居繁殖, 产生肠毒素; 肠毒素使细胞功能发生障碍, 水分与电解质失衡, 这是致泻的直接原因。粘附素有多个血清型, 且有种属特异性。根据调查了解, 我国仔猪腹泻病原的粘附素 80% 以上是 K88ac 型, 犊牛羔羊腹泻病原的粘附素中 K99 及 F41 相加占 50% 以上。不耐热肠毒素 LT 是常见的病因, 含有两个亚基: A 亚基是毒性部分; B 亚基具有与受体结合功能, 但无毒, 是各型病原菌共有的保护性抗原。

本成果的研究内容及特点有以下几方面:

(1) 用生物高技术从病原菌中分离特定致病因子基因, 进行分子无性繁殖与表达的研究; 又进一步作基因结构与功能关系等研究, 为构建疫苗菌株打下基础。

(2) 分别克隆了粘附素 K88ac 与肠毒素 LT 基因。后者又经体外改造, 在 A 亚基基因中部改变其结构, 使密码阅读框移位, 以保留部分 A 亚基产物但又失去其毒性作用; 而 B 亚基基因完整, 所编码产物有很好的免疫原性。按照疫苗的要求作重组菌株的设计, 将两种无毒的保护性抗原基因(粘附素 K88ac 和肠毒素 LTA⁻B⁺)组合在一起, 再经过一系列分子操作, 去除基因工程中常用作为标记的抗药性基因, 得到抗原表达比野生菌株高的 K88-LTB 双价

中国工程院院士。

本文于 1996 年 10 月 25 日收到。

工程疫苗菌株。该项工作属国际首创。

(3) 经免疫机理研究显示: K88-LTB 双价活疫苗因含上述两种类型保护性抗原, 具有抗菌作用与中和毒素的作用; 此疫苗既能激发细胞免疫反应, 又能激发体液免疫反应, 既有局部免疫, 又有全身免疫; 两种保护性抗原具有协同作用, 不只对早发性大肠菌腹泻 (俗称黄痢) 有效, 对迟发性大肠菌腹泻 (俗称白痢) 亦有很好的效果。以上几点是过去国内外疫苗未能达到的。

(4) K88-LTB 双价工程疫苗为活疫苗, 既能口服、通过粘膜免疫系统得到高免疫力, 也可作注射免疫, 易于推广使用。

(5) 设计出用生物技术将两种血清型粘附素 K99 与 F41 基因组合在同一载体上, 得到比野生菌抗原表达量高得多的重组疫苗菌株, 且便于生产。用菌株培养液提取获得 K99-F41 双价亚基疫苗, 系国内外首次报道。

(6) 据免疫程序研究与大量动物试验, 工程疫苗在孕母畜产前 2—3 周使用效果最好, 便于控制疫情, 这不同于国内外一般在产前 4 周的免疫时间。而且, 使用本疫苗是一次免疫孕畜、就使幼畜得到对疾病的预防, 方便省力。

(7) 经生产工艺研究, 两种疫苗的中试定型均采用玉米浆作为生产疫苗的培养基。玉米浆来源丰富, 成本低廉, 产菌量高, 生产工艺简单。

工程疫苗在全国各地数万头孕母畜使用观察, 不仅安全可靠, 无任何副作用, 而且效果显著, 几十万头免疫幼畜的腹泻保护率达 85% 以上, 腹泻死亡保护率在 90% 以上。本疫苗的使用, 提高了幼畜成活率, 幼畜增重快, 药物防治费用降低, 经济效益显著, 深受用户欢迎。同时, 还减少了人畜共患疾病, 改善了环境卫生, 促进了生物高技术研究与应用等, 具有重要的社会效益。

本项目中的不同研究内容曾获得军队科技进步奖一等奖 1 项、二等奖 3 项、三等奖两项, 各地推广使用获奖 5 项。1990 年国家“七五”攻关验收鉴定, 认为仔猪腹泻工程疫苗“达到国际同类工作的先进水平”, 颁发了国家“七五”科技攻关重大成果荣誉证书; 1991 年获农业部批准的一类新兽药证书, 次年获试生产文号, 是我国获政府批准生产的第一个基因工程疫苗。本疫苗经十多年在不同条件下使用的考验, 1995 年获国家科技进步奖一等奖。目前的任务是生物高技术的教育、普及, 产品的宣传、推广, 以使成果发挥更大的作用。

研究内容曾发表论文 27 篇, 疫苗使用的论文十余篇。

本项目的基础研究部分曾两次得到国家自然科学基金支持, 又获得解放军总后勤部科研专项资助, 一部分成为国家“七五”科技重点攻关项目并得到支持。本成果是基于科研人员对科学前沿领域的敏感与认识, 发挥了本研究所生物高技术上、中、下游实验室配套从事高目标研究的优势, 又与生产单位及几十个畜牧场紧密协作, 在各部门重视与支持下, 才获得的高科技研究成果、并很快转化为生产力, 从而得到科学发展与成果应用的双丰收。本成果经过的历程是典型的, 其经验与规律也是有价值的。

RECOMBINANT POLYVALENT VACCINES AGAINST DIARRHEA CAUSED BY ENTEROTOXIGENIC *E. COLI* IN NEONATAL LIVESTOCKS

Chen Tianmi Huang Cuifen

(*Institute of Biotechnology, AMMS, Beijing 100850*)

Key words recombinant vaccine, ETEC, prevention of diarrhea in piglets, prevention of diarrhea in calves and lambs

检疫性危险害虫苹果蠹蛾 在我国分布的调查研究

金瑞华

(中国农业大学, 北京 100094)

[关键词] 苹果蠹蛾, 在中国, 分布调查研究

苹果蠹蛾 [*Cydia pomonella* (L.)] 是世界上分布最广、为害最重的苹果、梨、桃、核桃等仁果类、核果类水果的毁灭性害虫。该虫以幼虫蛀果为害, 造成大量虫果, 并导致果实成熟前脱落和腐烂。据报道和观察, 该虫蛀果率普遍在 50% 以上, 严重的可达 70%—100%。因此, 该虫被许多国家和我国列为植物检疫危险性害虫。现在, 该虫已从原产地欧亚大陆的中南部一带, 传播到除南极洲以外的六大洲的几乎所有的苹果产区, 但在我国于 50 年代仅局限分布于新疆(张学祖, 1957)。英联邦农业局 (Commonwealth Agricultural Bureaux, CAB) 受联合国粮农组织 (FAO) 的委托, 于 1951 年, 1976 年和 1989 年三次公布的该虫世界分布地图上 [Distribution Maps of Pests. Series A; Map No. 9, *Cydia pomonella* (L.)] (CIE, 1951, 1976; IIE, 1989), 依据陈方洁等《中国果虫名录》(1936 年) 和胡经甫《中国昆虫名录》(1938 年) 的记述, 一再错误地将我国东部 (尤其是渤海湾沿岸一带) 划为该虫的分布区, 从而引起一些国家禁止或限制从我国进口苹果和梨等水果; 同时, 一些有该虫分布的国家也据此要求我国放宽对苹果等水果进口的检疫规定, 又构成了对我国广大的苹果、梨等水果产区的严重威胁。

为维护我国尊严与利益, 在国家自然科学基金委员会及有关部门的共同支持与资助下, 以“检疫性危险害虫苹果蠹蛾在我国分布的调查研究”立项, 开展了苹果蠹蛾在我国的分布调查

获国家自然科学基金资助项目。
本文于 1996 年 7 月 30 日收到。