

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710190266.7

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

[43] 公开日 2008年6月25日

[11] 公开号 CN 101205528A

[22] 申请日 2007.11.23

[21] 申请号 200710190266.7

[71] 申请人 南京师范大学

地址 210097 江苏省南京市宁海路122号

[72] 发明人 王 文 顾 伟 毕可然 黄 桦
王俊海

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 卢亚丽

权利要求书1页 说明书7页

[54] 发明名称

一种螺原体菌株及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种新型水生动物病原微生物，中华绒螯蟹螺原体 (*Spiroplasmaeriocheir* sp. Nov) CCTCC M 207170 以及它的用途。中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170 能用于建立动物模型，用于制备免疫检测试剂盒，用于防治药物筛选等，对水产动物疾病，特别中华绒螯蟹颤抖病的防治起到积极的作用。

1、一种水生动物病原微生物，其特征在于，它是中华绒螯蟹螺原体 (*Spiroplasma eriocheir* sp. Nov)，其保藏号为 CCTCC M 207170。

2、一种权利要求 1 所说的病原微生物的用途，其特征在于，通过病原的人工回感实验获得颤抖病动物模型。

3、一种权利要求 1 所说的病原微生物的用途，其特征在于，用于制备水产动物螺原体病免疫检测试剂盒。

4、根据权利要求 3 所说的用途，其特征在于，用中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170 制备抗体。

一种螺原体菌株及其应用

技术领域

本发明涉及一种水生动物的病原微生物，具体为中华绒螯蟹螺原体菌株及其用途。

背景技术

中华绒螯蟹颤抖病是近年来危害我国水产养殖的重大疾病，国内许多学者对此病进行了研究，但结果不尽相同。我们通过病理学、流行病学、细胞生物学及微生物柯赫氏（Koch's Rule）法则的验证，明确了该病的致病体及其传播途径；运用细胞生物学、微生物学和分子生物学方法鉴定出颤抖病病原体为螺原体类（*spiroplasma*）微生物（Wen Wang*, Bohai Wen, Gail E. Gasparich, Ningning Zhu, Liwen Rong, Jianxiu Chen and Zaikuan Xu. A spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) Microbiology 2004, 150:3035–3040），这是国际上首次在水生甲壳动物体内发现并分离培养出螺原体类菌株，也是水生动物的一种新型病原微生物。

发明内容

本发明的目的是提供一种水生动物的病原微生物及其用途。

所说的水生动物的病原微生物，它是中华绒螯蟹螺原体（*Spiroplasma eriocheir* sp. Nov），其保藏号为 CCTCC M 207170。

利用中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170，可以进行病原的人工回感实验从而获得供研究用的颤抖病动物模型。

中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170，用于制备水产动物螺原体病免疫检测试剂盒。例如：用中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170 制备抗体并用于中国专利申请 200710025337.8 所说的检测水生动物螺原体的酶联免疫试剂盒，该试剂盒包括包被液、洗涤液、小牛血清、一抗血清、酶结合物工作液（二抗）、显色液、终止液、阳性对照、阴性对照和酶标板条；所说的显色液分为四甲基联苯胺（TMB）、柠檬酸-磷酸盐缓冲液和双氧水；所说的阳性对照是含水生动物螺原体的样本，阴性对照是不含螺原体的样本，一抗血清为中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170 的多克隆抗体，酶结合物工作液为辣根过氧化物酶（HRP）

标记山羊抗兔 IgG 多克隆抗体。

中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170 具有螺原体属微生物的五大生物学特征：滤过性、螺旋性、运动性、无细胞壁及可在人工培养基中生长。在对数生长期表现为典型的螺旋及运动特性，直径 0.1-0.2 μm ，长度不一，最适生长温度为 30 度，最适 pH 为 7.2-7.6，耐受渗透压范围为 0.15-0.7M 蔗糖浓度，最高耐盐度为 30%。在最适培养条件下，达对数生长期的时间为 24h，生长代谢产酸，随着该病原微生物的繁殖生长，用酚红作指示剂的培养基由红逐渐变橘黄，36-48h 达稳定生长期，此时菌液浓度可达 10^8 - 10^9 /ml。另外，该病原微生物生长需要血清类物质提供营养，能水解尿素，因为缺乏细胞壁而对青霉素等抗生素不敏感。

用病原微生物回感中华绒螯蟹可复制出典型的颤抖病，回感克氏原螯虾也会令其病发致死。

本发明公开了一种水产动物病原体，能用于建立动物模型，用于制备免疫检测试剂盒，用于防治药物筛选等，对水产动物疾病，特别中华绒螯蟹颤抖病的防治起到积极的作用。

具体实施方式

在本发明中所使用的术语，除非有另外说明，一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

实施例一：菌种的分离、培养、保藏及复壮

1. 患颤抖病病蟹中螺原体的分离

病蟹来源：实验中用于分离螺原体的病蟹来源于安徽全椒、江苏的南京、宜兴、溧阳、扬州等地的养殖塘，体重 30-100g，经光镜、电镜及分子生物学检测，确诊为颤抖病病蟹。

从病蟹血淋巴液分离螺原体：活体病蟹第三步足基部 75%酒精局部消毒，一次性注射器抽取蟹血淋巴液与 PBS 等体积混匀，用孔径为 0.22 μm 滤器过滤，取 5 μl 滤液负染，电镜观察。

从病蟹组织分离螺原体：病蟹整体 75%酒精消毒，解剖，取约 0.2g 的病蟹组织（肢肌）放入无菌培养皿中，加入 PBS 缓冲液 2mL，用剪刀及牙签将病组织捣碎，静置 1h，用孔径为 0.22 μm 滤器过滤。

2. 螺原体的人工培养基培养

从病蟹血淋巴液或组织分离的滤液中取 50 μ l 接种至 1mLR2 培养基, 30 $^{\circ}$ C 温箱恒温培养。逐日观察培养基的颜色变化, 用 Nikon 相差显微镜检查是否有螺原体生长, 同时通过负染, 透射电镜观察螺原体形态, 待培养基变黄或菌体含量不再增多时转管培养。

注: 培养基及培养条件

R2 培养基成分:

Distilled water 84 mL;	}	调 pH 至 7.2-7.4 后高压灭菌;
PPLO broth base 1.5 g;		
Sucrose (8 g);		
Phenol red (0.2%) 1 mL;	}	220nm 滤器滤过
Bovine serum (15 mL);		
Penicillin G (1 M U/g) 100 mg		

最适 pH: 7.2-7.6, 最适温度: 30 $^{\circ}$ C, 一般接种培养 72 小后培养基开始变色 (由红变橘黄), 表明培养物存活并繁殖。

3. 纯培养的获得

梯度稀释培养法获得纯培养: 参照微生物的 CCU 记数方法 (colour change unit, 颜色改变单位法), 将培养至对数生长期的螺原体菌液用 R2 液体培养基作 1: 10 (v/v) 梯度稀释, 然后 30 $^{\circ}$ C 恒温箱内培养, 观察培养基颜色变化, 至最后变色一管生长至对数生长期, 再将该管作梯度稀释培养, 如此反复三次, 即可作为螺原体纯培养。

固体培养基培养及纯培养的获得: 螺原体经分离并由 R2 液体培养基培养出来后, 取 100 μ l 对数生长期的菌液用弯头玻棒均匀涂布于 R2 固体培养基, 30 $^{\circ}$ C 恒温箱内培养, 待菌落长出后 (培养基由红变黄), 挑取单菌落, 放入 R2 液体培养基, 如此反复三次, 可得螺原体纯培养。

由于螺原体固体培养菌落很小, 直径只有 0.1-0.2mm, 挑取单菌落误差较大, 所以本研究所用纯培养多由梯度稀释培养法获得。

4. 菌种保藏

冷冻保藏: 纯培养菌液培养至对数期后离心 (8000rpm \times 30min), 弃上清, 加入适量

的新鲜培养基悬浮，另加入 20% (v/v) 的甘油作为冷冻保护剂。

冻干粉保藏：纯培养菌液培养至对数期后冷冻干燥成冻干粉，其中添加脱脂奶粉作保护剂。此法可用于实验室长期保种。

该菌种保存在中国典型培养物保藏中心，保藏日期：2007-11-15；保藏编号：M 207170。

5. 菌种复壮（从冻干粉）

用 10mL R2 液体培养基将冻干粉溶解成悬浊液（菌原液），再以空白 R2 为溶剂，将菌原液作梯度稀释培养，1: 10 (V/V) 梯度稀释。一般稀释 5-6 个浓度梯度。30 度恒温培养，2-3 天后各浓度梯度培养基逐步由红变橘黄且澄清没有沉淀。培养基颜色变黄说明其中有菌体繁殖生长，从中吸取 10ul 作光镜（相差或暗视野）观察，有螺原体生长且形态数量良好的转接传代培养。

实施例二：分子生物学和蛋白质组学的研究

利用该菌株提取 DNA 和蛋白质进行分子生物学和蛋白质组学的研究，进一步明确蟹螺原体的分类地位以及它与其他螺原体的关系。

在分子生物学方面，该菌株 16S rRNA 基因部分序列（800 bp）BLAST 分析证明其与兔扁虱螺原体 *Spiroplasma mirum* 同源序列有 98% 的相似性，初步确定其是一种螺原体并可能与 *S. mirum* 有较近的亲缘关系；为了进一步证实该中华绒螯蟹螺原体菌株在螺原体属内的系统发生地位，我们基于该菌株 16S rRNA 基因几乎全部序列，23S rRNA, 16S-23S rRNA 间隔区全部序列和两个蛋白编码基因—拓扑结构酶 B (gyrB)，RNA 聚合酶 B (rpoB) 部分序列和 Genbank 内下载到的已知螺原体同源序列利用最大简约法、最大似然法和贝叶斯法进行了分析，所有分析都强烈支持中华绒螯蟹螺原体归属于螺原体属内的 Mirum 支系，并与 *S. mirum* 菌株呈现姐妹群的关系。此外，利用已有菌株 16S-23S rRNA 间隔区序列设计的一对引物能够特异性的检测到该中华绒螯蟹螺原体在江苏和安徽等病蟹内广泛存在。在全基因组 DNA 大小测定方面，我们利用低熔点琼脂糖包埋法提取到中华绒螯蟹螺原体完整基因组 DNA，包埋获得的全基因组 DNA 脉冲场电泳结果表明，中华绒螯蟹螺原体全基因组大小是 1600 kbp, *S. mirum* 菌株全基因组大小为 1300kbp，二者在基因组大小上存在很大的差异，证实二者属于两个不同的种。

此外,我们对中华绒螯蟹螺原体、*S. mirum*、植物螺原体(CR-1)和蜜蜂螺原体(CH-1)等不同来源菌株的全菌蛋白进行了分析,SDS-PAGE 结果显示中华绒螯蟹螺原体与植物和蜜蜂螺原体差异较大,而与 *S. mirum* 差异较小,但可以看出两者的明显差异。用人工回感实验方法,将以上不同菌株分别感染正常中华绒螯蟹,结果显示,只有中华绒螯蟹螺原体能够感染蟹,引起颤抖病,而其他菌株均对蟹没有致病性。生物学特性研究也证实中华绒螯蟹螺原体与 *S. mirum* 之间的差异,前者的生长的最适温度为 30 度,后者为 37 度;在对盐度的耐受性方面两者也有很大差异,前者可以耐受 30‰的盐度,而后者只能在 5‰以下盐度生长,20‰以上的盐度对 *S. mirum* 有很大程度的致死效应。

从以上的分子生物学、蛋白组学、生物学特性及感染特性等几个方面都证实我们分离的中华绒螯蟹螺原体是一种新型的病原微生物,虽然它与 *S.mirum* 的关系密切,但完全不同于 *S.mirum*, 是螺原体的新种类。

实施例三: 中华绒螯蟹颤抖病动物模型的建立

利用中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170,可以进行病原的人工回感实验从而获得供研究用的颤抖病动物模型。

方法: 健康中华绒螯蟹均购自市场,活力充沛,取少量血液作光镜、电镜检测,选择其中无颤抖病原体及其他杂菌寄生的个体为受试动物。对健康中华绒螯蟹第三步足基部 75%酒精局部消毒,一次性注射器接种分离培养的螺原体活菌体,回感剂量为 0.1mL/只,10 只/组,回感前留取正常血细胞为阴性对照。同步注射等剂量 R2 培养基的健康中华绒螯蟹作对照。回感后的中华绒螯蟹及对照组分别置于水族箱内饲养,水温控制在 28℃左右,每三天换一次水,密切关注其发病情况,每五天采一次血,光镜观察血细胞感染情况;血淋巴液戊二醛固定后,负染,透射电镜观察血淋巴液内含物情况。一般回感第 12-15 天左右,中华绒螯蟹开始出现颤抖症状,其血淋巴液中可以检测并重新分离培养出螺原体。

实施例四 : 检测水生动物螺原体的酶联免疫试剂盒

(1) 抗原的制备

抗原制备: 中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170 为病原,采用 0.4%甲醛 12-15 小时灭活。灭活病原以 12000r/min 离心 50min,洗涤,离心,重复 3 次,制备成抗原,并用电

镜鉴定抗原纯度，紫外分光光度计测定蛋白浓度。然后置 4℃ 冰箱保存备用。

(2) 一抗血清（多克隆抗血清）的制备

选用 2 公斤以上健康雄性新西兰大耳兔作为免疫动物，将中华绒螯蟹螺原体 CCTCC M 207170 作为免疫抗原，216 μ g/ml，4℃ 保存；

然后进行免疫注射程序，将 0.9ml 免疫抗原加 0.9ml 弗氏完全佐剂，充分混合，在新西兰大耳兔腹部皮下多点注射，每点 0.3ml（第一次免疫）；

一免一周后，用 1ml 免疫抗原加 1ml 弗氏完全佐剂，充分混合，在新西兰大耳兔腹部皮下多点注射，每点 0.4ml（第二次免疫）；

二免一周后，用 0.4ml 免疫抗原耳静脉注射（第三次免疫）；

三免一周后耳静脉微量取血，间接 ELISA 测 3 免抗体效价，若达不到要求次日继续耳静脉注射 0.5ml（第四次免疫）；

一周后，心脏采血，分离血清，得病原菌纯培养物的多克隆抗体，加入 0.1%NaN₃，在-70℃下保存。

(3) 酶结合物工作液（二抗）：购自北京博奥森生物技术有限公司。

(4) 阳性、阴性对照的制备：

阳性对照取自具有典型颤抖病症状的蟹和患螺原体病的虾，病蟹血淋巴液负染，电镜下观察，可见其含大量的螺原体。

阴性对照来自健康蟹和虾血淋巴液则观察到背景干净，没有螺原体。

(5) 小牛血清：购自中美合资兰州民海生物工程有限公司。

(6) 其他试剂的配制：

包被液：pH9.6 的碳酸缓冲液；

洗涤液：pH7.4，含 0.05%吐温-20 的磷酸缓冲液；

显色液：分为柠檬酸-磷酸盐缓冲液，四甲基联苯胺（TMB）固体，30%过氧化氢液体；

终止液：2mol/ml 硫酸溶液。

(7) 酶标条：FEP11096, 96 孔可拆板，购自南京布克生物技术有限公司。

(8) 检测水生动物螺原体的酶联免疫试剂盒

1# 碳酸缓冲液（包被液）	1.2ml	（1.5ml 离心管）
2# 洗板用洗涤液	50 ml	（1 个 50ml 冷冻管）

3# 小牛血清	280 μ l	(5ml 冷冻管)
4# 一抗	3 μ l	(1.5 ml 离心管)
5# 二抗	0.4 μ l	(1.5 ml 离心管)
6# TMB	0.15mg	(PCR 管)
7# 柠檬酸-磷酸盐缓冲液	1.5ml	(1.5ml 离心管)
8# 双氧水	7.5 μ l	(PCR 管)
9# 终止液	1.3ml	(1.5ml 离心管)
10# 阳性对照	5 μ l	(1.5ml 离心管)
11# 阴性对照	5 μ l	(1.5ml 离心管)
酶标条	1 条 12 孔	

本发明不限于这些公开的实施方案，本发明将覆盖在专利书中所描述的范围，以及权利要求范围的各种变型和等效变化。

专利名称(译)	一种螺原体菌株及其应用		
公开(公告)号	CN101205528A	公开(公告)日	2008-06-25
申请号	CN200710190266.7	申请日	2007-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	王文 顾伟 毕可然 黄桦 王俊海		
发明人	王文 顾伟 毕可然 黄桦 王俊海		
IPC分类号	C12N1/20 G01N33/53 G01N33/569 C07K16/18		
代理人(译)	卢亚丽		
其他公开文献	CN101205528B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新型水生动物病原微生物，中华绒螯蟹螺原体 (Spiroplasmaeriocheir sp.Nov)CCTCC M 207170以及它的用途。中华绒螯蟹螺原体CCTCC M 207170能用于建立动物模型，用于制备免疫检测试剂盒，用于防治药物筛选等，对水产动物疾病，特别中华绒螯蟹颤抖病的防治起到积极的作用。

Distilled water 84 mL;
PPL0 broth base 1.5 g;
Sucrose (8 g);

} 调pH至7.2-7.4后高压灭菌;