



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109294974 A

(43)申请公布日 2019.02.01

(21)申请号 201811231823.X

(22)申请日 2018.10.22

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C2018211 2018.09.28

(71)申请人 浙江省淡水水产研究所

地址 313001 浙江省湖州市吴兴区杭长桥
南路999号

申请人 成都天邦生物制品有限公司

(72)发明人 沈锦玉 曹铮 潘晓艺 夏焱春

姚嘉赞 蔺凌云 尹文林 刘忆瀚

陆裕肖 邢刚 岳丰雄 周涛

黄杰

(74)专利代理机构 成都天汇致远知识产权代理

事务所(普通合伙) 51264

代理人 韩晓银

(51)Int.Cl.

C12N 5/071(2010.01)

C12N 7/00(2006.01)

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/686(2018.01)

A61K 39/245(2006.01)

A61P 31/22(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

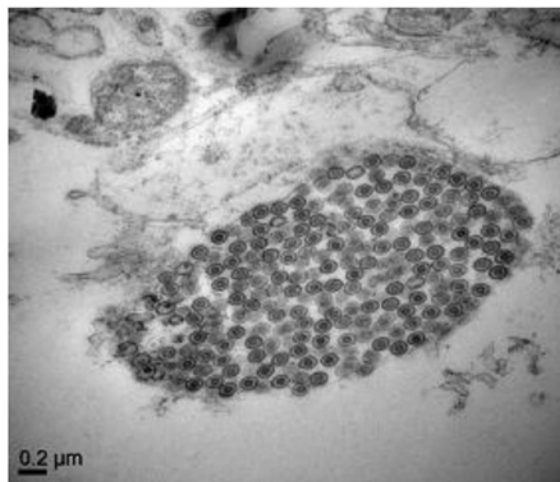
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种异育银鲫脊髓组织细胞系及其构建方法
与其应用

(57)摘要

本发明公开了一种异育银鲫脊髓组织细胞系及其构建方法与其应用,该细胞系分类名为异育银鲫脊髓组织细胞系(Spinal cord tissue cell lines of Carassius auratus gibelio, CSC),其保藏号为CCTCC NO:C2018211。上述的细胞系可应用于鲤疱疹病毒Ⅱ型分离、培养、检测和制备鲤疱疹病毒Ⅱ型的疫苗中。本发明为CyHV-2的分离鉴定及其完整的生物学特性的研究提供了必要的技术平台,为鲫鱼造血器官坏死症的防控奠定了重要的基础。



1. 一种异育银鲫脊髓组织细胞系 (Spinal cord tissue cell lines of *Carassius auratus gibelio*, CSC), 其特征在于, 其保藏号为 CCTCC NO: C2018211。

2. 权利要求1所述的异育银鲫脊髓组织细胞系的构建方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤1、脊髓组织的处理: 无菌条件下取出异育银鲫脊髓组织, 无菌处理为 $30 \sim 60 \text{mm}^3$ 的组织块, 放入含 L15 培养液的培养皿中;

步骤2、原代培养: 将步骤1中的组织块均匀地放入 T25 细胞培养瓶中, 放组织块的一面朝上, 培养瓶中添加 3ml 培养液, 过夜, 慢慢将培养瓶侧过来, 使组织块浸润培养液, 再将组织块的一面朝上, 期间不定期操作一次直至组织块边缘长出细胞, 将细胞培养瓶正置培养, 每 2~3 天更换培养液一次;

步骤3、传代培养: 原代培养异育银鲫脊髓组织细胞长成单层后, 加入胰蛋白酶消化液静置消化 1~2 分钟, 用培养液悬起细胞, 按 1 瓶传 2 瓶的方式进行传代培养, 待细胞再次形成单层后, 按照上述的细胞的传代培养方法进行下一次传代培养, 得到一种异育银鲫脊髓组织的细胞系 CSC。

3. 根据权利要求2所述的构建方法, 其特征在于, 所述的步骤1中的异育银鲫脊髓组织细胞 L15 培养液为含有 10~20% V/V 胎牛血清、100U/ml 青霉素、100 μg /ml 链霉素, pH 值 7.0~7.4 的培养液。

4. 根据权利要求2所述的构建方法, 其特征在于, 所述的步骤3中的细胞传代的胰蛋白酶消化液为 0.25% W/V 胰蛋白酶-EDTA 消化液。

5. 根据权利要求2所述的构建方法, 其特征在于, 步骤2和步骤3中的细胞培养、传代的温度为 $23 \sim 25^\circ\text{C}$, pH 值 7.0~7.4。

6. 权利要求1所述异育银鲫脊髓组织细胞系在鲤疱疹病毒 II 型分离、培养和检测中的应用。

7. 根据权利要求7所述的应用, 其特征在于, 所述鲤疱疹病毒 II 型为鲤疱疹病毒 II 型分离株。

8. 权利要求1所述异育银鲫脊髓组织细胞系在制备鲤疱疹病毒 II 型的疫苗中的应用。

9. 根据权利要求7所述的应用, 其特征在于, 所述鲤疱疹病毒 II 型为鲤疱疹病毒 II 型分离株。

一种异育银鲫脊髓组织细胞系及其构建方法与其应用

技术领域

[0001] 本发明属于水生生物细胞及水产养殖病害防控技术领域,具体地说,涉及一种异育银鲫脊髓组织细胞系及其构建方法与其应用。

背景技术

[0002] 鲤疱疹病毒Ⅱ型(Cyprinid herpesvirus Ⅱ,CyHV-2)又被称为疱疹病毒性造血器官坏死病病毒(Herpesviral haematopoietic necrosis virus,HVHNV)或金鱼造血器官坏死病毒(Goldfish haematopoietic necrosis virus,GFHNV),与鲤科鱼类的其他两种疱疹病毒CyHV-1(Carp pox)和CyHV-3(Koi herpesvirus,KHV)同属Alloherpesviridae科,Cypriniviruse属。CyHV-2于1995年首次被报道,1992~1993年间给日本西部养殖的金鱼造成巨大的经济损失,患病金鱼死亡率高达100%。随后其他国家和地区也相继有了该病暴发的报道,1997年春季在美国西海岸一用循环水养殖的金鱼幼鱼出现大量死亡,死亡率高达80%以上,后经证实是由CyHV-2感染。观赏鱼的国际贸易很大程度上促进了该病的全球传播,随后我国台湾、澳大利亚、英国养殖的金鱼相继暴发该病。2011年匈牙利报道了养殖的银鲫也发现了CyHV-2感染。2009年起,在我国鲫鱼的主要养殖区江苏省暴发了由CyHV-2引起的鲫鱼造血器官坏死病,截至2018年9月中旬,江苏省内射阳、大丰、宝应、高邮、东台等地病害发生面积超过10万亩,发病塘口的死亡率高达90%,造成的经济损失已达数亿元。与此同时,在湖北、湖南、江西、浙江等省份,也相继在患病鲫鱼体内检测出CyHV-2。该病毒传染性强、致死率高,给鲫鱼养殖业造成了重大的经济损失,严重威胁该产业的健康发展。

[0003] 细胞培养分离技术是最准确的病毒病诊断方法,通常是世界动物卫生组织(OIE)推荐的鱼类病毒检测的首选方法。但已有研究发现CyHV-2很难在鱼类病毒分离常用的细胞系中进行增殖。胖头鲤细胞(fathead minnow cells,FHM)、鲤鱼上皮瘤细胞(epithelioma popuasum cuprini,EPC)、草鱼卵巢细胞(grass carp ovary,CO)、草鱼肾细胞(grass carp kidney,CIK)均对CyHV-2不敏感,仅锦鲤鳍细胞(koi fin1,KF-1)能产生细胞病变效应(CPE),但病毒在KF-1细胞上传至第3~5代后,CPE消失且检测不到病毒核酸。虽然已建立了异育银鲫脑组织细胞系且对CyHV-2敏感,但由于发明者不对外供应,还是缺乏CyHV-2敏感的细胞系,限制了对CyHV-2的研究,因此建立对CyHV-2敏感的细胞系并研究该细胞系的生物学特性,对CyHV-2进行连续传代扩大培养从而深入研究病毒的特性,具有重要的意义。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供了一种异育银鲫脊髓组织细胞系及其构建方法与其应用,该细胞系可以用于分离、检测和培养鲤疱疹病毒Ⅱ型;用于对CyHV-2进行体外连续传代、扩大培养从而深入研究该病毒的特性。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明公开了一种异育银鲫脊髓组织细胞系(Spinal cord tissue cell lines of Carassius auratus gibelio,CSC),其保藏号为CCTCC NO:C2018211。

[0006] 本发明还公开了一种上述的异育银鲫脊髓组织细胞系的构建方法,包括以下步骤:

[0007] 步骤1、脊髓组织的处理:无菌条件下取出异育银鲫脊髓组织,无菌处理为30~60mm³的组织块,放入含L15培养液的培养皿中;

[0008] 步骤2、原代培养:将步骤1中的组织块均匀地放入T25细胞培养瓶中,放组织块的一面朝上,培养瓶中添加3ml培养液,过夜,慢慢将培养瓶侧过来,使组织块浸润培养液,再将组织块的一面朝上,期间不定期操作一次直至组织块边缘长出细胞,将细胞培养瓶正置培养,每2~3天更换培养液一次;

[0009] 步骤3、传代培养:原代培养异育银鲫脊髓组织细胞长成单层后,加入胰蛋白酶消化液静置消化1~2分钟,用培养液悬起细胞,按1瓶传2瓶的方式进行传代培养,待细胞再次形成单层后,按照上述的细胞的传代培养方法进行下一次传代培养,得到一种异育银鲫脊髓组织的细胞系CSC。

[0010] 可选地,所述的步骤1中的异育银鲫脊髓组织细胞L15培养液为含有10~20%V/V胎牛血清、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素,pH值7.0~7.4的培养液。

[0011] 可选地,所述的步骤3中的细胞传代的胰蛋白酶消化液为0.25%W/V胰蛋白酶-EDTA消化液。

[0012] 可选地,步骤2和步骤3中的细胞培养、传代的温度为23~25℃,pH值7.0~7.4。

[0013] 本发明还公开了一种上述的异育银鲫脊髓组织细胞系在鲤疱疹病毒Ⅱ型分离、培养和检测中的应用。

[0014] 可选地,所述鲤疱疹病毒Ⅱ型为鲤疱疹病毒Ⅱ型分离株。

[0015] 本发明还公开了一种上述的异育银鲫脊髓组织细胞系在制备鲤疱疹病毒Ⅱ型的疫苗中的应用。

[0016] 可选地,所述鲤疱疹病毒Ⅱ型为鲤疱疹病毒Ⅱ型分离株。

[0017] 与现有技术相比,本发明可以获得包括以下技术效果:

[0018] 1) 已有研究发现CyHV-2很难在鱼类病毒分离常用的细胞系中进行增殖。胖头鲤细胞(fathead minnow cells,FHM)、草鱼卵巢细胞(grass carp ovary,CO)、鲤鱼上皮瘤细胞(epithelioma popuassum cuprini,EPC)、草鱼肾细胞(grass carp kidney,CIK)均对CyHV-2不敏感,仅锦鲤鳍细胞(koi fin1,KF-1)能产生细胞病变效应(CPE),但病毒在KF-1细胞上传至第3~5代后,CPE消失且检测不到病毒核酸。而本发明采用分离培养对CyHV-2易感的异育银鲫的脊髓组织细胞,建立了对CyHV-2敏感的异育银鲫脊髓组织细胞系。

[0019] 2) 本发明对在CSC细胞上进行连续传代的鲤疱疹病毒Ⅱ型DNA检测验证,结果证实CSC细胞连续传代第10代仍可检测到病毒核酸;细胞病变效应(CPE)稳定且明显;将出现病变效应的细胞做超薄电镜切片观察,透射电镜结果显示,在CSC细胞中存在CyHV-2成熟病毒粒子及其复制过程,证明CyHV-2在CSC细胞中具有良好的生物学活性。

[0020] 3) 本发明立足于鲤疱疹病毒Ⅱ型的分离、检测及培养,建立CyHV-2敏感细胞系CSC,为CyHV-2的分离鉴定及其完整的生物学特性的研究提供了必要的技术平台,为鲫鱼造血器官坏死症的防控奠定了重要的基础。

[0021] 4) 本发明建立的细胞系CSC,该细胞系的应用还包括但不限于:用于分离培养鲤疱疹病毒Ⅱ型、检测及疫苗研发中的应用,细胞及水平上开展鲤疱疹病毒Ⅱ型感染途径、感

染机理、致病机制等。

[0022] 当然,实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

附图说明

[0023] 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解,构成本发明的一部分,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0024] 图1是本发明不同代次异育银鲫脊髓组织细胞CSC示意图;其中,a为原代异育银鲫脊髓组织细胞,b为第3代异育银鲫脊髓组织细胞系;

[0025] 图2是本发明第26代异育银鲫脊髓组织细胞系的染色体;

[0026] 图3是本发明异育银鲫脊髓组织细胞系感染CyHV-2后示意图;其中,a为正常细胞,b为感染后第4天细胞,c为感染后第6天细胞。

[0027] 图4是本发明不同培养代次CyHV-2的PCR检测结果示意图;其中,M:100bp Marker;1:第2代CSC细胞培养CyHV-2细胞毒;2:第3代CSC细胞培养CyHV-2细胞毒;3:第4代CSC细胞培养CyHV-2细胞毒;4:第5代CSC细胞培养CyHV-2细胞毒;5:第6代CSC细胞培养CyHV-2细胞毒;6:第7代CSC细胞培养CyHV-2细胞毒;7:CSC细胞对照;8:阴性对照;9: CyHV-2阳性对照;

[0028] 图5是本发明第7代CyHV-2细胞毒感染CSC的细胞电镜超薄切片示意图。

具体实施方式

[0029] 以下将配合实施例来详细说明本发明的实施方式,借此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

[0030] 本发明实施例所用试剂,如未特别说明,均购自生化商店;所用实验技术,如未特别说明,均为常规技术。

[0031] 本发明具体实施例中涉及的材料及试剂:

[0032] 1) 实验鱼与毒株

[0033] 异育银鲫,体重约100~140g,体长约17~20cm,来源于浙江省淡水水产研究所试验基地。实验前于室内暂养1周。鲤疱疹病毒II型由本实验室分离保存。

[0034] 2) 主要试剂与耗材

[0035] L15细胞培养基、青霉素/链霉素、磷酸缓冲液(PBS)、胰蛋白酶-EDTA、二甲基亚砜(DMSO)、秋水仙素均购自Sigma公司;胎牛血清购自GIBICO公司;DNAzol核酸提取试剂为Invitrogen产品;PCR用rTaq酶、dNTPs为TaKaRa公司产品。细胞培养瓶、移液管、细胞冻存管均购自Corning公司;制备透射电镜超薄切片所需试剂及耗材均购自北京中兴百瑞公司。

[0036] 3) 主要仪器设备

[0037] II级生物安全柜(Hfsafe-4B2);倒置显微镜(Nikon);恒温培养箱(Sanyo,MIR-153);CCD相机(Nikon NIS Elements F530);低速冷冻离心机(EPPENDORF,5424R);超低温冰箱(MDF-382E);液氮罐(TYD-35-125);超薄切片机(UC7,Leica);透射电子显微镜(H-7650,Hitachi)。

[0038] 实施例1

[0039] 异育银鲫脊髓组织细胞系的建立,其步骤如下:

[0040] (1) 脊髓组织的处理:无菌条件下取出异育银鲫脊髓组织,无菌处理为30~60mm³

的组织块,放入含L15培养液的培养皿中;

[0041] (2) 原代培养:将步骤(1)中的组织块均匀地放入T25细胞培养瓶中,放组织块的一面朝上,培养瓶中添加3ml培养液,过夜,慢慢将培养瓶侧过来,使组织块浸润培养液,再将组织块的一面朝上,期间不定期操作一次直至组织块边缘长出细胞,将细胞培养瓶正置培养,每2~3天更换培养液一次;原代细胞与传代细胞的形态如图1所示。

[0042] (3) 传代培养:原代培养异育银鲫脊髓组织细胞长成单层后,加入0.25%W/V的胰蛋白酶-EDTA消化液静置消化1~2分钟,用培养液悬起细胞,按1瓶传2瓶的方式进行传代培养,待细胞再次形成单层后,按照上述的细胞的传代培养方法进行下一次传代培养,得到一种异育银鲫脊髓组织的细胞系CSC;

[0043] 其中,传代用的胰蛋白酶消化液为0.25%W/V胰蛋白酶-EDTA消化液,细胞培养、传代的温度为23~25℃,pH值7.0~7.4;所述的异育银鲫脊髓组织细胞培养液为含有10~20%V/V胎牛血清、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素,pH值7.0~7.4的L15培养液。

[0044] 上述的构建方法方法简单,易行。

[0045] 该细胞系已于2018年9月28日提交至中国典型培养物保藏中心进行保藏,保藏编号:CCTCC NO:C2018211,分类命名:异育银鲫脊髓组织细胞系(Spinal cord tissue cell lines of *Carassius auratus gibelio*,CSC),地址:中国武汉武汉大学。

[0046] 实施例2

[0047] 异育银鲫脊髓组织细胞系CSC的生物学特性:

[0048] (1) 形态学:细胞类型为成纤维样细胞。

[0049] (2) 生长特性:传代的CSC细胞30min后开始贴壁,6h后贴壁完全;群体倍增时间为48h。

[0050] (3) 稳定性:异育银鲫脊髓组织细胞系CSC至申请日前已传至42代,增殖稳定。

[0051] (4) 冻存与复苏:

[0052] CSC细胞复苏后贴壁快速,生长形态、状况与没有冻存的细胞基本相似,未出现明显差别。复苏细胞用台盼蓝染色,经细胞统计计数,约(78.56±6.10)%的细胞不着色,具有细胞活性。

[0053] (5) 染色体分析

[0054] 第26代异育银鲫脊髓组织细胞系CSC处于对数生长期,加入终浓度为20μg/ml的秋水仙素,25℃孵育4h后消化收集细胞,用0.075mol/L的KCl溶液低渗处理25min后加入预冷的卡诺固定液,1000rpm离心5min去上清后再用预冷的卡诺固定液固定3次,每次15min。冷滴片法滴片,干燥后用5%Giemsa染色25min,干燥后显微镜观察。在观察的100个分裂相细胞中,第26代异育银鲫脊髓组织来源细胞的染色体数为156条(图2),与三倍体异育银鲫的染色体特征吻合,即异育银鲫三倍体的全部染色体156条,不含外源鲤鱼的染色体。

[0055] 实施例3

[0056] 异育银鲫脊髓组织细胞系的应用,其过程如下:

[0057] (1) 感染鲤疱疹病毒Ⅱ型病料的采集及处理:

[0058] 采集刚死亡的感染鲤疱疹病毒Ⅱ型的病鱼肾脏、脾脏和脑、脊髓组织,剪碎并加等体积PBS匀浆,5000rpm4℃离心15min后经0.22μm滤膜过滤制备成无菌组织匀浆液,分装后保存于-80℃备用;

[0059] (2) 鲤疱疹病毒 II 型在 CSC 的增殖:

[0060] CSC 培养至细胞单层约 80% 后, 弃去培养基经无血清的细胞维持液清洗 2 遍后, 将上述处理过的病料组织匀浆液上清 0.2ml 接种于 CSC 细胞单层, 24℃ 吸附 1h, 期间每隔 15~20min 轻微晃动培养瓶一次以便均匀吸附。待吸附结束后, 换血清浓度为 2% 的 L15 维持液继续 24℃ 培养, 逐日观察细胞病变 (CPE), 至病变达 80% 后收获病毒, 该病毒是鲤疱疹病毒 II 型分离株的来源。

[0061] (3) 鲤疱疹病毒 II 型细胞毒核酸的提取及 PCR 检测:

[0062] 将出现明显病变的 CSC 细胞反复冻融 2 次后经 DNAzol 提取病毒 DNA。利用 PCR 检测 CyHV-2 的方法检测该病毒。PCR 扩增用引物

[0063] CyHV2-366F 为: GGACTTGCGAAGAGTTTGATTCTAC;

[0064] CyHV2-366R 为: CCATAGTCACCATCGTCTCATC;

[0065] 取扩增条件为: 94℃ 预变性 5 分钟, 94℃ 变性 30 秒, 60℃ 退火 30 秒, 72℃ 延伸 30 秒, 35 个循环后 72℃ 5 分钟。

[0066] 同时取阳性对照 DNA 模板做阳性对照, 分别取 CSC 细胞 DNA 和纯水做阴性对照。扩增产物经 2% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

[0067] (4) 鲤疱疹病毒 II 型感染 CSC 的电镜观察

[0068] 将感染第 7 代 CyHV-2 细胞毒的 CSC 细胞经 2% 戊二醛固定后, 四氧化锇再固定, 再经脱水包埋后进行超薄切片, 醋酸铀-枸橼酸铅双染色后, 透射电镜观察。

[0069] (5) 结果

[0070] 鲤疱疹病毒 II 型病鱼组织匀浆接种与 CSC 细胞单层 4d 后出现细胞变圆或空泡化、固缩、形成合胞体、细胞间隙变大; 6d 后 CSC 细胞融合并形成多核巨细胞、细胞单层脱落产生拉网现象, 出现典型的细胞病变效应 (CPE), 并且传代至第 10 代 CPE 稳定 (图 3), 而正常的 CSC 细胞未见任何变化。

[0071] 提取不同培养代数的 CyHV-2 细胞培养物 DNA, 进行 PCR 检测, 经过两轮 PCR 扩增得到 357bp 的片段, 与阳性对照的扩增条带大小一致 (图 4), 结果均判定为阳性。

[0072] 通过透射电镜观察感染第 7 代 CyHV-2 的 CSC 细胞, 可观察到大量成熟的 CyHV-2 病毒粒子, 说明 CyHV-2 在 CSC 细胞中具有良好的生物学活性 (图 5), 进一步证明了本发明所建立的异育银鲫脊髓组织细胞系对病毒的敏感性, 可用于病毒的分离, 培养及检测。同时, 可作为研究鲤疱疹病毒 II 型生物学特性的细胞模型, 制备鲤疱疹病毒 II 型的疫苗。

[0073] 上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例, 但如前所述, 应当理解发明并非局限于本文所披露的形式, 不应看作是对其他实施例的排除, 而可用于各种其他组合、修改和环境, 并能够在本文所述发明构想范围内, 通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围, 则都应在发明所附权利要求要求的保护范围内。

序列表

<110> 浙江省淡水水产研究所 成都天邦生物制品有限公司

<120> 一种异育银鲫脊髓组织细胞系及其构建方法与其应用

<130> 2018

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 1

ggacttgcca agagtttgat ttctac 26

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 2

ccatagtcac catcgtctca tc 22

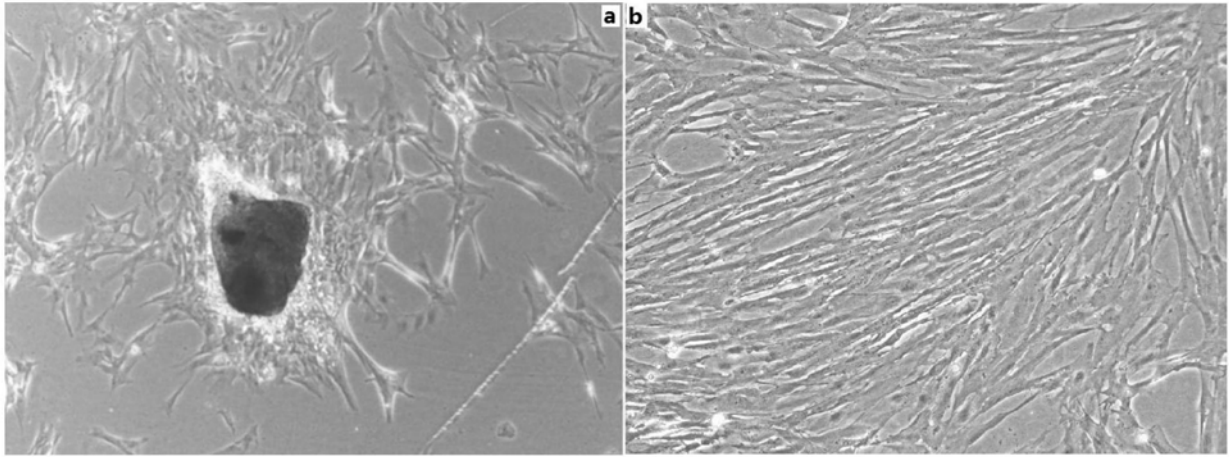


图1

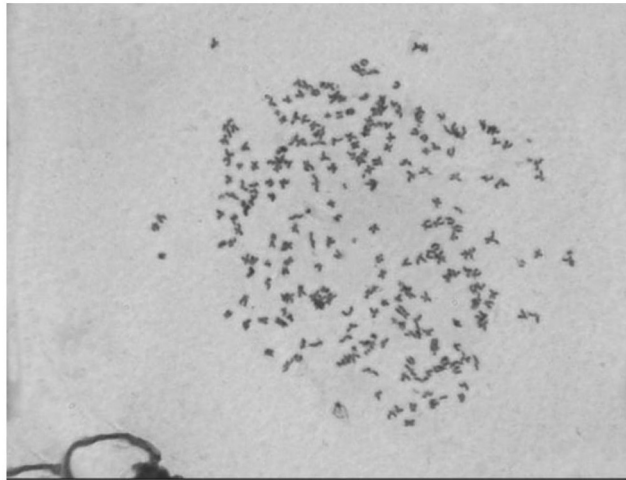


图2

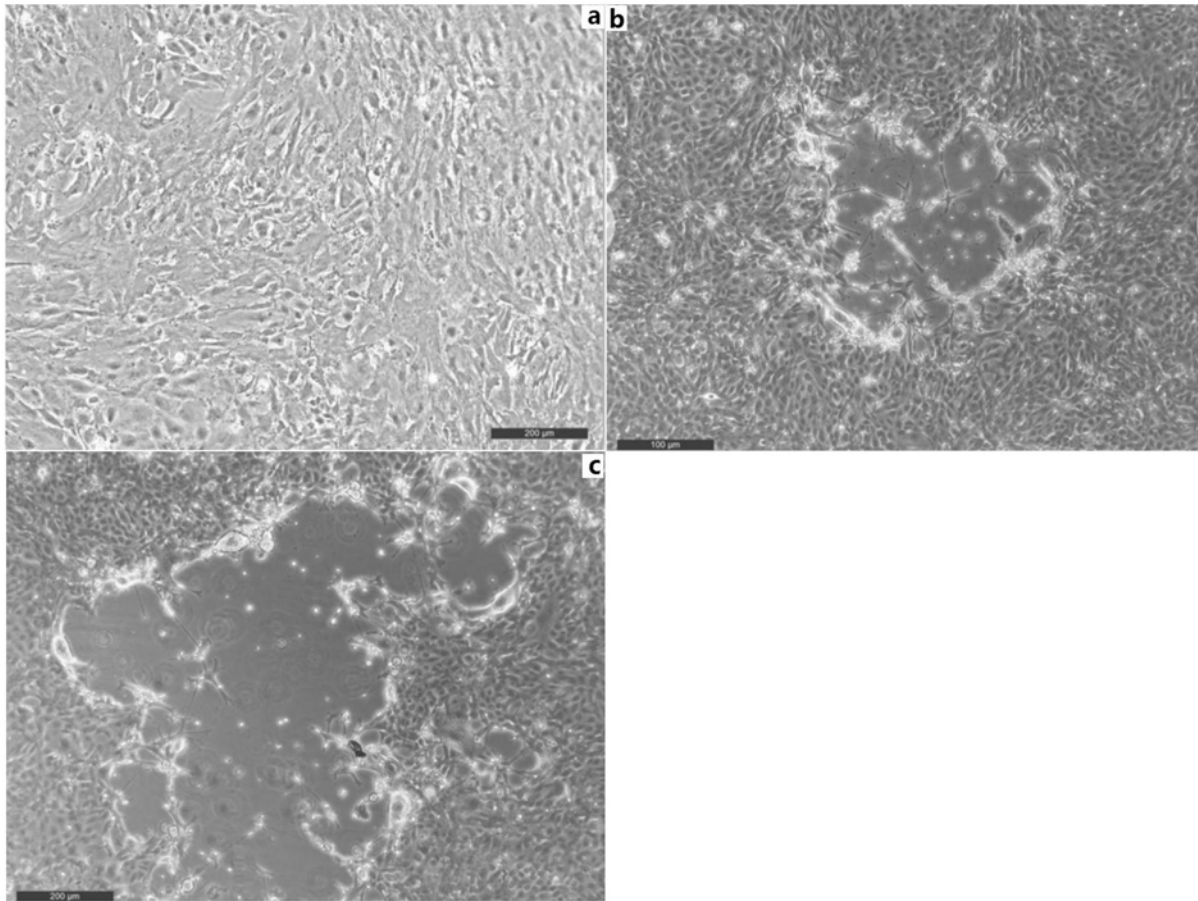


图3

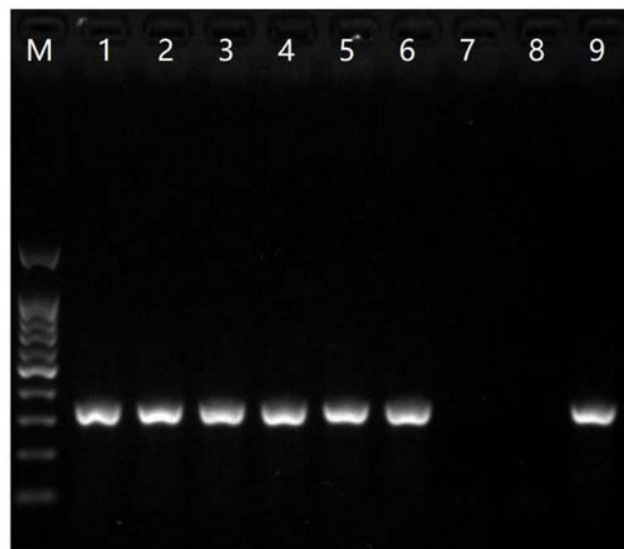


图4

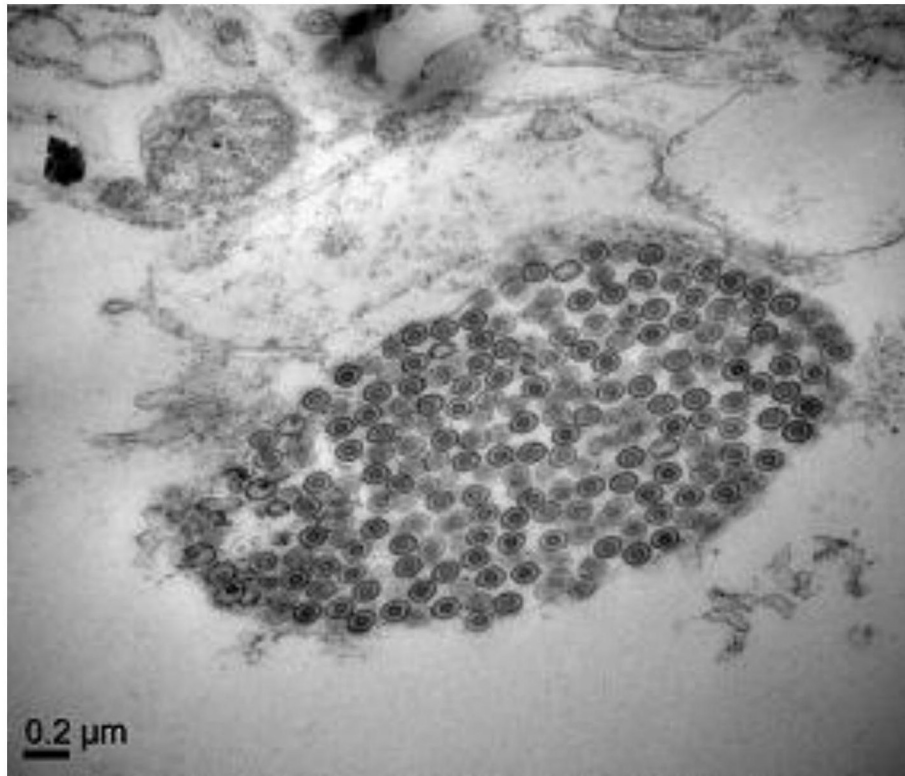


图5