

## 蜜蜂螺原体的分离鉴定及致病性研究\*

阮康勤<sup>1</sup> 周秀文<sup>2</sup> 张晶<sup>2</sup> 于汉寿<sup>1,2,\*</sup> 纪燕玲<sup>1</sup> 王志伟<sup>1</sup> 陈永萱<sup>1</sup>

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

(南京农业大学生物学实验中心 南京 210095)

**摘要:** 从患“爬蜂病”的蜜蜂体内分离到一株螺原体 M10, 具有典型的螺原体形态和运动性, 能透过 0.22 $\mu$ m 孔径的滤膜, 在含青霉素浓度为 2000U/mL 的 R-2 培养基中生长良好。该菌株生长需要血清, 能利用葡萄糖、精氨酸、不能利用尿素, 其 16S rDNA 序列与 *Spiroplasma melliferum* BC-3 (= ATCC33219) 同源率为 99.86%。通过饲喂菌液的方式, 发现供试蜜蜂 4d 开始出现“爬蜂病”病症, 15d 内 71% 的蜜蜂死亡, 说明 M10 对蜜蜂具有较强的致病性, 且感染致死的蜜蜂体内螺原体的分离率为 100%, 利用螺原体特异性 16S rDNA 引物在感染致死的蜜蜂的不同部位(头、胸、腹、足)均能扩增出螺原体 16S rDNA, 反映了螺原体对蜜蜂的系统性感染。

**关键词:** 螺原体, 生物学特性, 16S rDNA, 致病性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)04-0695-05

### Identification and Pathogenicity of a Spiroplasma Isolated from Honeybee\*

RUAN Kang-Qin<sup>1</sup> ZHOU Xiu-Wen<sup>2</sup> ZHANG Jing<sup>2</sup> YU Han-Shou<sup>1,2,\*</sup> JI Yan-Ling<sup>1</sup> WANG Zhi-Wei<sup>1</sup> CHEN Yong-Xuan

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

(Life Science Laboratory Center of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** M10, a spiroplasma isolated from honeybee showed a helical morphology and a contractile movement in R-2 medium. The isolate M10 could pass through a 220nm membrane and resist to penicillin (2000U/ml). It must grow in medium with serum. Glucose could be used as its source of carbon instead of sucrose. Arginine could be metabolized and urea could not. The 16S rDNA of M10 shared 99.86% similarity with the typical strain *Spiroplasma melliferum* BC-3 (= ATCC33219). M10 can cause serious disease to honeybees through feeding cultures, the honeybees showed symptoms of spiroplasmosis around 4 days after feeding and the death rate reached to 71% around 15 days. The isolation rate of spiroplasmas from dead honeybees was as high as 100%. Using primers of Spiroplasma-specific 16S rDNA, 16S rDNA of spiroplasma was amplified in the various parts of honeybees, such as heart, chest, abdomen and appendage of the dead honeybees. The results indicated that M10, which caused spiroplasmosis, could infect honeybees systemically.

**Key words:** Spiroplasma, Biological Characteristics, 16S rDNA, Pathogenicity

螺原体(Spiroplasma)是一类螺旋状、无细胞壁的原核生物,它的基因组非常小(780kb~2220kb),是原核生物中能独立生活和自我复制的最简单的生命形式<sup>[1]</sup>。螺原体个体极小,直径为20nm~500nm,没有细胞壁和鞭毛,仅靠单层膜包裹整个细胞,常作为研究运动的模式生物<sup>[2,3]</sup>。目前发现的螺原体有34个血清组,其中血清组I有9个亚组,血清组VIII和XVI各有3个亚组,但仅36个种给与拉

丁文双名并被详细描述<sup>[4]</sup>。螺原体主要存在于昆虫体内、植物体内和植物花表面,它和宿主的关系可分为共生、致病和互生3种<sup>[4]</sup>。1976年,在美国Maryland州首次发现由*Spiroplasma melliferum*引起的一种蜜蜂病害—螺原体死亡病(Spiroplasmosis);此后,在法国发现由*S. apis*引起的蜜蜂“五月病”(May disease),这两种病害给蜜蜂养殖造成较大的损失<sup>[5,6]</sup>。在国内,陈永萱等于1988年首次从患“爬

\*南京农业大学引进人才基金资助项目(No. 804052)

\*\*通讯作者 Tel: 025-84395531, E-mail: yuhans@njau.edu.cn

收稿日期: 2006-11-23, 修回日期: 2007-03-14

蜂病”的蜜蜂体内分离到螺原体,并对其基本生物学特性作了详细的研究<sup>[7]</sup>。

螺原体分离、培养及观察较一般细菌困难,相关报道较少,国内对螺原体的研究仅限于基本生物学特性及不同螺原体之间的血清学关系<sup>[7]</sup>,而目前16S rDNA序列分析已成为螺原体分类鉴定最有效的手段之一<sup>[4,8]</sup>;董秉义等用注射法发现蜜蜂和植物花螺原体对蜜蜂均具有致病性<sup>[9,10]</sup>,但未进行病原的再分离及进一步的病理学研究。本文首先从患“爬蜂病”的蜜蜂体内分离得到M10菌株,通过对其形态、生物学特性及16S rDNA的研究初步确定其分类地位,并通过饲喂菌液这一途径来研究M10对蜜蜂的致病性,为进一步研究蜜蜂螺原体的致病机理及“爬蜂病”的防治提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 蜜蜂螺原体的分离及纯化

分离所用培养基是由C-3G简化后的R-2培养基<sup>[7]</sup>。主要成分是PPLO broth(1.5%, Difco公司)胎牛血清(15%, V/V)蔗糖(10%, W/V)和酚红(1%, V/V), pH7.2~7.4。

从蜂箱前采集只能爬行的蜜蜂,用1%次氯酸钠表面消毒3min~5min,再用无菌水洗涤4次,用无菌的镊子取出蜜蜂内脏,在5mL的R-2培养基内碾碎,浸泡3min后用孔径0.45 $\mu$ m的微孔滤膜加压过滤,移0.5mL滤液于含1.5mL新鲜培养基的指形管中,30 $^{\circ}$ C静置培养,逐日观察培养基颜色变化,并用暗视野显微镜(Olympus BH-2型)观察验证<sup>[7]</sup>。分离菌株的纯化用梯度稀释法进行<sup>[4]</sup>。

### 1.2 蜜蜂螺原体的形态及生物学特性

**1.2.1 蜜蜂螺原体的形态及运动性观察** 取0.5mL处于不同生长期的螺原体培养液,用等体积4%戊二醛(内含0.03mol/L磷酸缓冲液, pH7.3~7.5)固定,于4 $^{\circ}$ C静置1d~3d,吸一滴固定后液体置于铜网上,静置2min,用滤纸吸干溶液,用1.5%的磷钨酸钠溶液(pH7.0)染色40s,再用滤纸吸干,风干后用透射电子显微镜(Hitachi H7650型)观察其形态。在暗视野显微镜下观察其运动性。

**1.2.2 蜜蜂螺原体的滤过性及对青霉素的抗性** 取1mL培养物用孔径0.22 $\mu$ m的滤膜加压过滤,在暗视野显微镜下检查是否有菌体存在。在R-2培养基中加入不同单位的氨苄青霉素钠以检查螺原体对青

霉素的抗性<sup>[4]</sup>。

**1.2.3 蜜蜂螺原体对几种物质的利用及血清的需求** 分别用1%的葡萄糖、1%的精氨酸及0.2%的尿素替代R-2培养基中的蔗糖,然后接种20 $\mu$ L对数生长期的菌体;在研究螺原体生长对血清需求中,取20 $\mu$ L对数生长期的菌体接种于不含马血清的R-2培养基<sup>[4,7]</sup>。30 $^{\circ}$ C静置培养,连续转管3次以上,逐日观察培养基颜色变化,并用暗视野显微镜观察验证。以接种R-2培养基作对照,重复3次。

### 1.3 蜜蜂螺原体的16S rDNA分析

**1.3.1 螺原体总DNA的提取** 采用Chelex-100树脂法提取蜜蜂螺原体的总DNA<sup>[11]</sup>。取1mL对数生长期的培养物,13000r/min离心15min,沉淀加入200 $\mu$ L 5% Chelex-100(Sigma公司),剧烈振荡数秒,混合物置于56 $^{\circ}$ C水浴30min,剧烈振荡10s,99 $^{\circ}$ C水浴8min,离心,上清液用于PCR反应。

### 1.3.2 蜜蜂螺原体16S rDNA序列分析

利用PCR技术,采用细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACCTTGTACGACTT-3'),以螺原体总DNA为模板扩增其16S rDNA<sup>[12]</sup>。采用凝胶回收试剂盒(Axygen公司)对扩增到的片段进行回收,将回收产物酶连到pMD19-T载体上,转化至*E. coli* DH5 $\alpha$ 通过蓝白斑挑选转化子,经过培养后提取质粒,酶切验证插入片段大小,测序由Invitrogen公司完成。利用BLAST将测序结果在NCBI([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))中与相关的16S rDNA序列进行同源性分析。下载与菌株16S rDNA同源并经过菌种鉴定的序列,用ClustalX 1.8进行多重序列对比,然后将此生成的文件输入到MEGA 3.0采用邻接法生成系统发育树。

### 1.4 蜜蜂螺原体的致病性

**1.4.1 蜜蜂螺原体的感染和再分离** 购买健康的意大利蜂(*Apis mellifera*),置于38.5cm $\times$ 27cm $\times$ 30cm的白纱笼中,每笼100只,停食3h~4h后,饲喂蘸有对数生长期菌液的冰糖,每24h饲喂1次,室温下通风处(15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)饲养15d,观察记录不能飞翔的症状出现时间,死蜂及时挑出,并记录死蜂数,计算死亡率及校正死亡率。对照组饲喂蘸有新鲜培养基的冰糖,每组两个平行,重复3次。将处理组和对照组的死蜂随机挑取20只,进行螺原体的再分离,并计算再分离率。

**1.4.2 分子生物学检测** 利用Chelex-100树脂法提

取死蜂组织(处理组和对照组)死蜂的不同部位(头、胸、腹、足)螺原体纯培养物、感染死亡后再分离得到的培养物的总DNA,其中提取昆虫组织DNA时加入20mg/mL蛋白酶K1.5 $\mu$ L~2.0 $\mu$ L,利用螺原体特异性16S rDNA引物F28(5'-CGCAGACGGTTTAGCAAGTTTGGG-3')和R5(5'-AGCACCGAACTTAGTCCGACAC-3')进行扩增<sup>[11,13,14]</sup>。PCR反应体系:DNA模板1 $\mu$ L,10 $\times$ 缓冲液(20mmol/L Tris-HCl,20mmol/L KCl,1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>)2.5 $\mu$ L,dNTP(10mmol/L,2.5mmol/L each)0.5 $\mu$ L,引物(0.2 $\mu$ mol/L)各1 $\mu$ L,Taq酶0.5 U,加ddH<sub>2</sub>O至25 $\mu$ L。反应程序为:96 $^{\circ}$ C预变性2min,94 $^{\circ}$ C变性1min,65 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸1.5min,共30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min,以*E. coli*和*B. subtilis*作阴性对照。反应产物在2%琼脂糖凝胶上电泳检测(85V,30min)<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜜蜂螺原体的分离及纯化

4~5月间,常有蜜蜂(*Apis mellifera*)在蜂箱前不能飞翔,只能爬行,翅膀微卷并下垂,呈现严重的病态,不久就会死亡,有病态的蜜蜂中90%能分离出螺原体。分离时,30 $^{\circ}$ C下培养3d~5d,R-2培养基就由红变黄,用暗视野显微镜能检出有螺原体生长。由于螺原体菌落非常小,故将其中一个分离物用梯度稀释法进行纯化。本研究选择南京前湖附近蜂群的分离物M10进行各项试验。

### 2.2 螺原体M10的形态及生物学特性

螺原体M10在对数期及稳定期可呈典型的螺旋状(图1),除螺旋形外还有其它芽状、串珠状等不规则形态,衰亡期菌体变得细长,菌体自身及菌体之间极易缠绕并聚集成团,螺原体长度为0.89 $\mu$ m~11.88 $\mu$ m,菌体直径为37.04nm~370.40nm,在液体培养基中呈翻滚式运动,有些菌体具有明显的尖端结构和纤毛状结构。能透过0.22 $\mu$ m的滤膜,在含青霉素(2000U/mL)的R-2培养基中生长良好。该菌株生长需要血清,能利用葡萄糖作为碳源,强烈代谢精氨酸,不能利用尿素。

### 2.3 螺原体M10的16S rDNA序列分析及系统发育树的构建

将螺原体M10的16S rDNA(序列号:DQ452377)

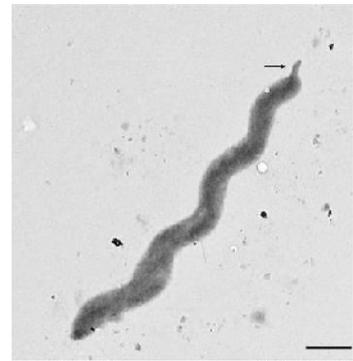


图1 M10负染透射电镜照片  
(箭头处示尖端结构)标尺500nm

序列在NCBI上比对,发现它与*Spiroplasma melliferum* BC-3(=ATCC33219)同源性最高(99.86%)利用邻接法,循环1500次得到系统发育树(图2),发现M10与*Spiroplasma melliferum*在一个分支上,并以65%的支持率聚类。再结合以上形态学及生物学特性,可将M10初步鉴定为*Spiroplasma melliferum*(Clark T B),属于第一血清组第二亚组。

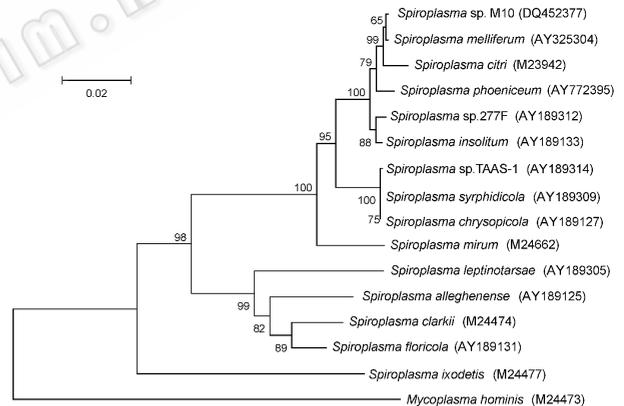


图2 基于16S rDNA序列构建的系统发育树(NJ法,1500次)

### 2.4 螺原体M10的致病性研究

通过饲喂新鲜菌液的方法对螺原体进行致病性研究,发现蜜蜂(*Apis mellifera*)被感染后第4天出现症状,表现为骚动不安,在笼中乱飞乱撞,随后只能爬行,直至抽搐而死,口器吐出,与自然状态下患“爬蜂病”的蜜蜂症状相似,死亡率为71%,校正死亡率达47%。感染致死的蜜蜂体内螺原体再分离率为100%,而正常死亡的蜜蜂体内均未分离出螺原体(表1)。以上结果表明,螺原体M10对意大利蜂(*Apis mellifera*)具有较强的致病性,是蜜蜂“爬蜂病”的病因之一。

表 1 螺原体 M10 对意大利蜂的致病性

处理	症状出现 天数	死亡率 (%)	校正死亡率 (%)	螺原体 分离率(%)
饲喂螺原体 M10	4	71	47	100
饲喂培养基	-	24	-	0

注: - 未出现

在进行分子生物学检测时,利用螺原体特异性 16S rDNA 引物 F28 和 R5,不但能从螺原体纯培养物和发病后蜜蜂的再分离物中扩增出长度为 271bp 的片段,而且能从病死的蜜蜂体内,甚至不同部位,如

头、胸、腹、足均扩增出该片段,对照组中正常死亡的蜜蜂体内则不能扩增出,以 *E. coli* 和 *B. subtilis* 总 DNA 为模板也不能扩增出该片段(图 3、图 4)。将扩增产物进行测序验证,发现该序列属于螺原体 M10 的 16S rDNA 全长中较为保守的一段(序列号: DQ397514),说明该螺原体特异性引物对于螺原体来说特异性很强。患病蜜蜂的不同部位都含有螺原体 16S rDNA,反映了螺原体对蜜蜂的侵染可能是系统性的。

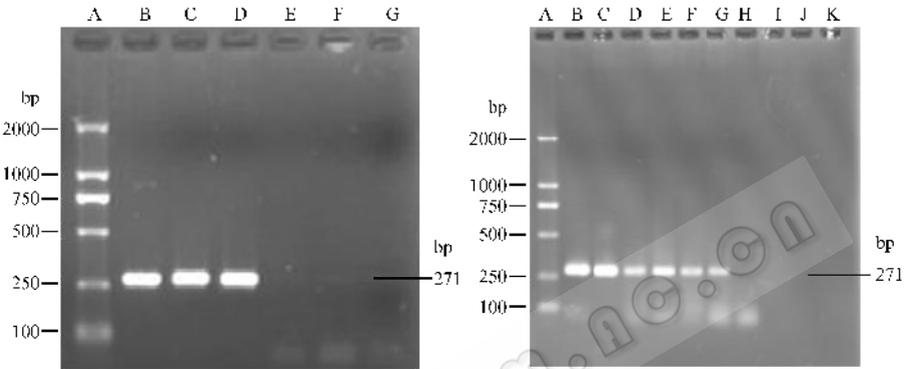


图 3(左) 利用螺原体特异性 16S rDNA 引物扩增的电泳图

A: marker, B: M10 纯培养物, C: 从患病蜜蜂体内分离的螺原体(饲喂 M10), D: 饲喂 M10 致死的蜜蜂组织, E: 正常死亡的蜜蜂组织(饲喂培养基), F: *E. coli*(阴性对照), G: *B. subtilis*(阴性对照)

图 4(右) 利用螺原体特异性 16S rDNA 引物扩增蜜蜂不同部位的电泳图

A: marker, B: M10 纯培养物, C: 从患病蜜蜂体内分离的螺原体(饲喂 M10), D: 患病蜜蜂的头部(饲喂 M10), E: 患病蜜蜂的胸部(饲喂 M10), F: 患病蜜蜂的腹部(饲喂 M10), G: 患病蜜蜂的足(饲喂 M10), H: 正常死亡的蜜蜂组织(饲喂培养基), I: *E. coli*(阴性对照), J: *B. subtilis*(阴性对照), K: PCR 空白对照

### 3 讨论

根据螺原体分类标准<sup>[4,8,15]</sup>,本研究从形态学、生物学特性及 16S rDNA 几个方面对分离菌株 M10 进行研究,初步鉴定 M10 为属于第一血清组第二亚组的 *Spiroplasma melliferum*(Clark T B)。分离菌株 M10 的生物学特性与陈永萱等从蜜蜂体内分离的菌株 CH-1 类似<sup>[7]</sup>,在 16S rDNA 的系统发育树上也高度聚类(另文发表)。另外,通过饲喂菌液这一途径,发现螺原体 M10 对蜜蜂具有较强的致病性,这与董秉义等结果一致<sup>[9]</sup>,但董秉义等大多采用微量注射法感染蜜蜂,该法对蜜蜂损伤较大,本研究中采用饲喂菌液法更接近蜜蜂在自然状态下的感染方式,说明螺原体可通过中肠在蜜蜂体内增殖。本研究从感染致死的蜜蜂体内进行病原的再分离,发现螺原体的分离率达 100%,而对照组中正常死亡

的蜜蜂未能分离出,从 Koch's 法则角度充分证明了螺原体 M10 是蜜蜂“爬蜂病”的病因之一。

本研究采用 Chelex-100 树脂法提取螺原体总 DNA,该法简单快捷,全过程仅 1h 左右,可检测出浓度为 1 个/mL 的螺原体的存在<sup>[8]</sup>,故该法配合螺原体特异性 16S rDNA 引物可用来快速检测环境中螺原体的存在,相比常用的血清学检测技术更为简单灵敏。

利用分子生物学手段对患病蜜蜂进行检测时发现螺原体 16S rDNA 特异性引物对螺原体具有高度的特异性,该引物是在比较螺原体和其它细菌 16S rDNA 可变区和保守区基础上设计的,能在绝大多数螺原体中扩增出该片段,在其它细菌及人体白细胞中则扩增不出<sup>[11,13,14]</sup>。利用 PCR 方法从患病蜜蜂的头、胸、腹、足中都检测到有螺原体的存在,说明螺原体对蜜蜂的侵染可能是系统性的,但其致

病机理需要通过病理组织切片进一步研究。

致谢 在螺原体的分离培养过程中,得到南京师范大学王文教授和顾伟老师的热情帮助;在电镜样品的制作及照片的拍摄过程中,得到了南京农业大学生命科学实验中心胡冰老师的大量帮助,在此表示真诚的感谢!

### 参考文献

- [ 1 ] Carle P, Laigret F, Tully J G, *et al.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, **45**: 178 ~ 181.
- [ 2 ] Trachtenberg S. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2004, **7**: 78 ~ 87.
- [ 3 ] Shaevitz J M, Lee J Y, Fletcher D A. Cell, 2005, **122**: 941 ~ 945.
- [ 4 ] Regassa L B, Gasparich G E. Frontiers in Bioscience, 2006, **11**: 2983 ~ 3002.
- [ 5 ] Clark T B. American Bee Journal, 1978, **118**: 18 ~ 23.
- [ 6 ] Mouches C, Menara A, Tully J G, *et al.* Ann Inst Microbiol ( Paris ),

1983, **134A**: 383 ~ 397.

- [ 7 ] 陈永萱,薛宝娣,郭永红. 中国科学( B 辑 ), 1988, **31**: 815 ~ 820.
- [ 8 ] Whitcomb R F, Williamson D L, Gasparich G E, *et al.* In: First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes ( invited lecture ). Available online: [www.uniud.it/phytoplasma/intconf.doc](http://www.uniud.it/phytoplasma/intconf.doc).
- [ 9 ] 董秉义,陈永萱,许少玉,等. 南京农业大学学报, 1993, **16**( 2 ): 37 ~ 41.
- [ 10 ] 董秉义. 蜜蜂杂志, 1997, **10**: 22 ~ 23.
- [ 11 ] Wang W, Gu W, Ding Z F, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 2005, **249**: 131 ~ 137.
- [ 12 ] Gasparich G E, Whitcomb R F, Dodge D, *et al.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, **54**: 893 ~ 918.
- [ 13 ] Linda M N, Carlos R P, Marcela S, *et al.* Diseases of Aquatic Organisms, 2004, **62**: 255 ~ 264.
- [ 14 ] Frank O B, Srikanta D, Robert F G. Experimental and Molecular Pathology, 2004, **77**: 49 ~ 56.
- [ 15 ] Bradbury J M. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, **51**: 2227 ~ 2230.