(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2013 年 12 月 19 日 (19.12.2013)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2013/185337 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/21 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/076961

(22) 国际申请日: 2012 年 6 月 15 日 (15.06.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **华东理工大学 (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **王启要 (WANG, Qiyao)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号生物反应器工程国家重点实验室 431 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **刘琴 (LIU, Qin)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号生物反应器工程国家重点实验室 431 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **张元兴 (ZHANG, Yuanxing)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号生物反应器工程国家重点实验室 431 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **王亚敏 (WANG, Yamin)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号生物反应器工程国家重点实验室 431 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **吴海珍 (WU, Haizhen)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号生物反应器工程国家重点实验室 431 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **肖婧凡 (XIAO, Jingfan)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号生物反应器工程国家重点实验室 431 信箱, Shanghai 200237 (CN)。

(74) 代理人: **上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC)**; 中国上海市桂平路 435 号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i)和 48.2(a)(viii))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) **Title**: EDWARDSIELLA TARDA MUTANT STRAIN AND APPLICATION THEREOF

(54) **发明名称** : 迟钝爱德华氏菌突变株及其应用

(57) **Abstract**: Provided are an Edwardsiella tarda mutant strain and application thereof, and particularly a mutant strain having a biological barrier and an attenuated mutant strain having a biological barrier.

(57) **摘要**: 提供了迟钝爱德华氏菌突变株及其应用，尤其是提供了具有生物学屏障的突变株和具有生物学屏障的减毒突变株。

WO 2013/185337 A1

迟钝爱德华氏菌突变株及其应用

技术领域

本发明涉及鱼用疫苗和海洋生物安全防范。更具体地说，本发明涉及具备生物学屏障的迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)突变株及其应用。

背景技术

为了实现海水养殖业的可持续发展，遏制各种环境因素和养殖密度激增等造成的养殖鱼类病害日益严重的发展趋势，世界粮农组织结合发达国家渔业发展的成功经验(Ormonde P.Fisheries resources: trends in production, utilization and trade. In: Nomura Ⅰ(ed.). The State of World Fishery and Agriculture 2002. Rome: FAO Information Division, 2002, p3～p45)，倡导“系统管理途径”(System management approaches, SMA)养殖模式预防各种病害的发生。这一措施中的一个主要内容就是提倡以疫苗接种为代表的各种免疫防治技术的应用。这些措施的采用将大大减少化学药物的使用，既避免了对环境的污染，又增加了水产品的消费安全性。作为符合环境友好、可持续发展战略的经济有效的疾病控制策略和手段，接种疫苗在现代水产养殖规范中正成为世界各国研究和开发的主要前沿和应用领域。

目前，接种疫苗因其安全性、可靠性和持久性，已成为世界范围内防治水产养殖病害发生及暴发的主要手段。疫苗具有针对性强、抗病周期长、可终身免疫、效果显著和防治主动的特点。以病原菌细胞灭活体为基础形式的灭活疫苗(Kill vaccine)为水产养殖病害防治提供了有效手段，但灭活疫苗普遍具有给药不便(注射给药才具有较好的免疫保护力)的技术应用缺陷，对于需要免疫成千上万数量的鱼类养殖业来说极为不便，给药成本往往不能被水产养殖业所承受。而且，对于病害发生严重的鱼苗和幼鱼则无法实施注射给药，同时，对许多病害灭活疫苗往往效果不佳或无效。这一切都给水产养殖病害免疫防治技术的广泛应用带来了阻碍。

水产养殖业的产业特点要求病害防治技术必须经济、应用实施方便。因此，疫苗产品的开发除高效价的技术要求外，免疫成本必须低廉，不能超出养殖业的承受能力。减(弱)毒活疫苗因具有给药方便(可浸泡给药)、免疫效价高(可

减少给药剂量)、成本低廉、可开发广谱疫苗(活菌疫苗往往具有交叉保护性)的新技术优势，已成为当前国际上水产养殖用疫苗研究和开发的热点和前沿领域。

爱德华氏菌属是导致养殖鱼类细菌性疾病的一类常见的病原体，具体分为迟钝(缓)爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)，鲶鱼爱德华氏菌(*E. ictaluri*)和保科爱德华氏菌(*E. hoshinae*)。由它们引起的鱼类出血性败血症统称为爱德华氏菌病(edwardsiellosis)。该病传播面积广，无明显季节性，感染率及死亡率高，危害的种类多，有鲤鱼，罗非鱼，鳗鲡，鲶鱼，鲑鱼，鳟鱼，鲆鲽等大多数具有较高经济价值的鱼种。此外，迟钝爱德华氏菌还感染贝类、爬行类、两栖类、鸟类、哺乳类。值得注意的是，迟钝爱德华氏菌还是一种重要的人畜共患病原菌，它是爱德华氏菌属中唯一感染人类的成员。目前，我国养殖鱼类爱德华氏菌病病害比较严重的病原主要为迟钝爱德华氏菌。美国专利有利用利福平筛选得到野生毒株的自然减毒突变体作为减毒活疫苗的报道(Evans J J, Klesius, P H and Shoemaker C A. Modified live *Edwardsiella tarda* vaccine for aquatic animals, 2006, United States Patent 7067122)。目前在我国尚无该病害的有效防治措施。

目前，已经鉴定的与迟钝爱德华氏菌毒力相关的因子包括溶血素、几丁质酶、铁载体、过氧化氢酶、细胞黏附因子、三型分泌系统(TTSS)及六型分泌系统(T6SS) (*Edwardsiella tarda* -Virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen, Microbes and Infection, 2012,14:26-34.)。此外，黏附至宿主细胞表面对于迟钝爱德华氏菌感染具有重要贡献，而其黏附由菌毛介导，表现为甘露糖不敏感或敏感型的血细胞凝集。近期完成的迟钝爱德华氏菌 EIB202 全基因组测序工作为其毒力因子的鉴定提供了基因水平的研究基础(Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. PLoS ONE 2009, 4(10): e7646)。在对迟钝爱德华氏菌 EIB202 基因组注释中发现，双精氨酸转运系统(Twin-arginine translocation, Tat)对 33 个假定的 Tat 系统底物以及他们的共转运蛋白的分泌具有重要作用。而爱德华氏菌属的 Tat 系统在其生理适应能力及毒力方面的作用还有待鉴定。

目前在世界范围内还没有开发出针对迟钝爱德华氏菌的疫苗，只有关于灭活的迟钝爱德华氏菌以及亚单位疫苗的相关报道(Development of an effective *E. tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*), Fish & Shellfish Immunology. 2008, 25:208-212)。而相关研究揭示 *esrB* 突变株作为针对爱德华

氏菌病的减毒活疫苗的潜在应用价值(A live attenuated *Edwardsiella tarda* vaccine, CN200710015285.6; Construction and characterization of a live, attenuated *esrB* mutant of *Edwardsiella tarda* and its potential as a vaccine against the haemorrhagic septicaemia in turbot, *Scophthamus maximus* (L.), Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23:521-530)。此外，研究亦发现迟钝爱德华氏菌天然弱毒株 ATCC15947 和 E22，以及一株利福平抗性突变株 TX5RM 可作为减毒活疫苗候选株，通过口服、浸泡或注射给药方式对牙鲆可以提供有效的免疫保护(Analysis of the vaccine potential of a natural avirulent *Edwardsiella tarda* isolate. Vaccine, 2010, 28: 2716-2721; The efficacy of five avirulent *Edwardsiella tarda* strains in a live vaccine against Edwardsiellosis in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29: 687-693; Isolation and analysis of the vaccine potential of an attenuated *Edwardsiella tarda* strain. Vaccine, 2010, 28: 6344-6350)。U.S. Pat. No. 6,019,981 展示了目前商业化的带有标记的抵抗鲶鱼爱德华氏菌的疫苗(Modified live *Edwardsiella ictaluri* against enteric septicemia in channel catfish. U.S. Pat. No. 6,019,981, 2000)。然而，这些疫苗会存在毒力回复突变的可能，而且上述疫苗都没有考虑到环境和生物安全性。

我们之前已经在迟钝爱德华氏菌野生毒株的基础上利用无标记基因缺失突变的策略，构建了两株减毒活疫苗(迟钝爱德华氏菌野生毒株的无标记基因缺失减毒突变株、相关制剂及其应用，CN 201010541646.2, 2010；一种迟钝爱德华氏菌野生毒株的无标记基因缺失减毒突变株、相关制剂及其应用，ZL 200910052707.6, 2009)，它们都缺失了芳香族氨基酸合成酶 AroC。在后续的研究中发现可能是它们的减毒效果过于显著致使其在宿主体内很快被清除而不能产生更长期的保护效果。

在减毒活疫苗以及其他微生物转基因(genetically modified organisms, GMO)技术的发展和应用过程中，为了防止微生物逃逸至自然环境中需要开发生物学屏障(Biological containment)。Molin 等的发明(Molin S.R., Andersson P. K., Gerdes K. A. S., Klemm P.. Biological containment, 1995, U.S. Pat. 5,670,370; Molin S.R., Andersson P. K., Gerdes K. A. S., Klemm P.. Biological containment, 1995, U.S. Pat. 5,702,916)利用可控复制子基因 ParB 来提供生物学屏障。此外其他类型的毒素-抗毒素系统，例如裂解蛋白 E，亦可用于生物学屏障的构建(Guan et al. 2011, Iron-regulated lysis of recombinant *Escherichia coli* in host releases

protective antigen and confers biological containment, Infect Immun, 2011, 79: 2608–2618)。而上述生物限制系统均采用了复杂的调控回路，使得自杀元件的特异性和效率难以控制，同时使得自杀回路的突变率提升。而基于芳香族氨基酸合成酶(如 AroA、AroC、AroD)、嘧啶合成酶(ThyA)、嘌呤合成酶(PurA 和 PurE)、天冬氨酸-b-半醛合成酶(Asd)等突变所形成的营养缺陷型突变株的生物学屏障则会产生基础代谢方面的显著影响。

因此开发一种安全有效、回复突变率低、对菌株自身基础代谢影响甚微的生物学屏障就成为亟待解决的问题。

发明内容

本发明提供了一种以迟钝爱德华氏菌野生毒株为出发菌株，利用无标记基因缺失突变策略构建的具有生物学屏障、回复突变率低的突变株。该突变株具有海洋生物学屏障机制，即在低盐环境(如鱼体中)中能稳定存在，而在高盐环境下(如海水环境中)不稳定并且死亡，易被海水环境清除，可以防止减毒活疫苗株在自然海水环境中的逸散，提高了减毒活疫苗株的环境和生物安全性。本发明实施例采用了迟钝爱德华氏菌野生毒株 EIB202，该毒株从我国黄海海域养殖渔场内爆发的爱德华氏菌病的病鱼体内分离得到，是一株强毒性的迟钝爱德华氏菌菌株(*Edwardsiella tarda* EIB202，肖婧凡等，“Isolation and identification of fish pathogen *Edwardsiella tarda* from mariculture in China”，《Aquaculture Research》 Vol.40，2009)，并且于 2008 年 5 月 1 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏号为 CCTCC-M 208068。

具体地说：本发明包括以下内容：

一种迟钝爱德华氏菌突变株，其特征在于其 *tatABCD* 基因失活因而不表达 TatABCD 蛋白。

实施方式之一中，所述迟钝爱德华氏菌突变株的 *tatABCD* 基因被缺失。

实施方式之一中，所述迟钝爱德华氏菌突变株是保藏号为 CCTCC M 2011338 的迟钝爱德华氏菌 EIBAV11092701。

实施方式之一中，所述迟钝爱德华氏菌突变株还缺失了迟钝爱德华氏菌内源性质粒 pEIB202。

实施方式之一中，所述迟钝爱德华氏菌突变株的特征还在于其 *eseBCD* 和 *escA* 基因失活因而不表达 EseBCD 和 EscA 蛋白，并且不含迟钝爱德华氏菌野生株的内源性质粒 pEIB202。

实施方式之一中，所述迟钝爱德华氏菌突变株的 *eseBCD* 和 *escA* 基因被缺失。

实施方式之一中，所述迟钝爱德华氏菌突变株是保藏号为 CCTCC M 2011339 的迟钝爱德华氏菌 EIBAV11092801。

一种免疫组合物，包含本发明的迟钝爱德华氏菌突变株作为免疫原性组分。

实施方式之一中，所述免疫组合物中所述迟钝爱德华氏菌突变株的浓度为 10^3-10^9 CFU/ml。

本发明迟钝爱德华氏菌突变株用于制造抗鱼类爱德华氏菌病的药物的应用。

用本发明迟钝爱德华氏菌突变株防治鱼类爱德华氏菌病的方法。

本发明的优点包括但不限于：

1. 提供了具备生物学屏障的迟钝爱德华氏菌无标记突变株，提高了在该系统基础上所构建的减毒株的生物安全性，防止其在海水环境中的逸散。

2. 本发明的迟钝爱德华菌株减毒株相对于野生毒株毒力显著降低，同时能提供有效的免疫保护，能够有效地保护鱼类免受爱德华氏菌毒株导致的迟钝爱德华氏菌病的侵害，免疫效果显著，对于所免疫的鱼体具有非常好的迟钝爱德华氏菌病的防治效果；

3. 本发明的迟钝爱德华菌减毒株不携带任何抗生素抗性标记、内源性质粒 pEIB202 和其它标记，对环境不存在传播抗生素抗性的潜在危险；无任何外源性基因片段，毒力相关基因大片段缺失，毒力不可回复，在海水环境中很容易由于海水的高盐度而被清除，极大消除向环境传播大量毒性病原体的可能性，具有技术上的环境和产品生物安全性，有实际的商业开发应用价值；

4. 本发明的迟钝爱德华菌减毒株遗传背景清楚，易于区分疫苗株与野生株，便于对环境进行监控，提高疫苗的环境生物安全性和可控性；

附图说明

图 1: 实施例中，Overlap PCR 技术制备 *tatABCD* 缺失片段 F1F2 的图解。

图 2: 实施例中，两次同源重组构建 *tatABCD* 基因缺失突变株的图解。

图 3: 实施例中，利用 *cat* 基因(氯霉素抗性基因)和自杀质粒筛选无内源性质粒方案的图解。

图 4A-C: 迟钝爱德华氏菌野生株 EIB202 与 *tatABCD* 缺失株 EIBAV11092701 在不同盐浓度下的生长状况。

图 5A-C: 迟钝爱德华氏菌野生株 EIB202 及 *tatABCD* 缺失株 EIBAV11092701 在不同温度(A. 28°C；B. 16°C；C. 10°C)和不同盐浓度的可培养状况检测。

具体实施方式

本发明实施方式之一提供了一种迟钝爱德华氏菌突变株，其 *tatABCD* 基因失活因而不表达 TatABCD 蛋白。本发明实验证明，迟钝爱德华氏菌的 Tat 系统缺损时，例如 TatABCD 蛋白缺失时，变得对盐度敏感，具体表现为随盐浓度升高而出现生长抑制，基于此形成了本发明的海洋环境生物学屏障。本发明的海洋环境生物学屏障表现为，突变株或基于该突变株的疫苗在鱼类体内低盐度条件下正常生长和繁殖，而在海水高盐度环境下则生长抑制，迅速衰败和消亡，由此避免了基因逃逸等生物安全风险。本发明在实施例中例举了以基因缺失方式来使 *tatABCD* 基因失活，即制造了 *tatABCD* 基因缺失突变的迟钝爱德华氏菌突变株。然而，本领域技术人员知道还可以用其它基因灭活技术，例如诱变、反义核酸和 RNA 干扰技术等，造成 *tatABCD* 基因缺失或 Tat 系统缺损，从而达到与本申请实施例所示相同或相当的效果。作为实施例之一，本发明提供了一种含有 *tatABCD* 基因缺失突变的迟钝爱德华氏菌突变株，命名为 EIBAV11092701，于 2011 年 9 月 29 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏号 CCTCC M 2011338。实施方式之一，本发明的迟钝爱德华氏菌 *tatABCD* 基因缺失突变株不含内源性质粒 pEIB202。

本发明的另一实施方式提供了一种迟钝爱德华氏菌减毒突变株，其 *tatABCD* 基因失活因而不表达 TatABCD 蛋白，其 *eseBCD* 和 *escA* 基因失活因而不表达 EseBCD 和 EscA 蛋白，并且不含迟钝爱德华氏菌野生株的内源性质粒 pEIB202。本发明实验证明，迟钝爱德华氏菌的 TTSS 系统缺损例如 EseBCD 和 EscA 蛋白缺失且不含迟钝爱德华氏菌野生株的内源性质粒 pEIB202 时，其毒力显著降低，但具有显著的免疫保护作用，因此是适宜的减毒疫苗株原料。本发明在实施例中例举了以基因缺失方式来使 *eseBCD* 和 *escA* 基因失活，即制造了 *eseBCD* 和 *escA* 基因缺失突变的迟钝爱德华氏菌突变株。然而，本领域技术人员知道还可以用其它基因灭活技术，例如诱变、反义核酸和 RNA 干扰技术等等，造成 EseBCD 和 EscA 蛋白缺失或 TTSS 系统缺损，从而达到与本申请实施例所示相同或相当的效果。作为实施例之一，本发明提供了一种含有 *tatABCD*，*eseBCD* 和 *escA* 基因缺失突变并且不含迟钝爱德华氏菌野生株的内

源性质粒 pEIB202 的迟钝爱德华氏菌减毒突变株，命名为 EIBAV11092801，于 2011 年 9 月 29 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏号 CCTCC M 2011339。

本发明的突变株可按照迟钝爱德华氏菌常规培养方法进行培养。例如，培养基可选用 LB 培养基，其中的蛋白胨可以是酪蛋白胨、胰蛋白胨或大豆蛋白胨，可以补加 NaCl 至 0.5%。本发明实施例之一选用了胰蛋白胨。

本发明的另一实施方式提供了一种免疫组合物，其中包含本发明的迟钝爱德华氏菌突变株作为免疫原性组分，优选本发明的减毒突变株。本发明的免疫组合物还可以包含各种适宜的载体和免疫佐剂。所述载体例如水和生理盐水。本发明实施例之一采用 0.9% (9g/L) NaCl 浓度的生理盐水作为载体。所述免疫组合物的 pH 以生理 pH，尤其是目标鱼类的体内生理 pH 为宜，例如 pH 6-8，pH 7-7.2。

本发明免疫组合物的形式之一是即用组合物，其中作为免疫原性组分的本发明减毒突变株的浓度可以采用常规技术手段试验确定，也可参照本领域实践经验来试验确定。例如，本发明的免疫组合物中，所述迟钝爱德华氏菌减毒突变株浓度的数量级为 10^3-10^9 CFU/ml，或者 10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8 或 10^9 CFU/ml，或者以上所述任意两两构成的区间，例如 10^3-10^8 CFU/ml。在一例浸泡液型组合物中，减毒突变株浓度的数量级为 10^6-10^8 CFU/ml。

本发明的另一实施方式提供了一种防治鱼类爱德华氏菌病的方法，采用本发明的迟钝爱德华氏菌减毒突变株来免疫鱼类。可以将本发明的减毒突变株作为疫苗使用，也可以将其配置和合适的免疫组合物使用。水产养殖业常规免疫方式均适用于本发明，例如注射和浸泡。适宜的使用浓度为 10^3-10^9 CFU/ml，或者 10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8 或 10^9 CFU/ml，或者以上所述任意两两构成的区间，例如 10^3-10^8 CFU/ml。例如，注射免疫时，减毒突变株剂量的数量级为 10^3 CFU/g(体重)，例如 5×10^3 CFU/g。又例如，浸泡免疫时，减毒突变株浓度的数量级为 10^6-10^8 CFU/ml。实施例之一中，采用本发明减毒突变株的浸泡时间为 15-120 分钟。

本发明的另一实施方式是采用本发明的迟钝爱德华氏菌突变株，尤其是减毒突变株来制造抗鱼类爱德华氏菌病的药物，例如抗爱德华氏菌的鱼用疫苗。

实施例

为了能够更清楚地理解本发明的技术内容，特举以下实施例详细说明。

实施例 1　无标记基因缺失减毒突变株的构建

(一) *tatABCD* 基因缺失菌株的构建

1) PCR 扩增获得所需基因片段

如图 1 所示，以迟钝爱德华氏菌野生毒株 EIB202(保藏编号 CCTCC-M 208068，保藏地点为武汉大学中国典型培养物保藏中心，保藏日期为 2008 年 5 月 1 日)的基因组为模版，利用下列扩增引物：

P1：GGAAGATCTCGTCTACAGCACAGCATGGA，SEQ ID NO: 1

P2：GCTTCAGCCAATCCGAACCCAGAGTACGCA，SEQ ID NO: 2

P3：GGGTTCGGATTGGCTGAAGCAGGTGACTGA，SEQ ID NO: 3

P4：ACATGCATGCATCGCTGCTGTACGCCTCTT，SEQ ID NO: 4

*tatABCD-de*F：CCTGTTCAATACCGCACGGCGTTTT，SEQ ID NO: 5

*tatABCD-de*R：TGCGGCCATCCATCATATCGCTCGG，SEQ ID NO: 6

首先分别用 P1 和 P2、P3 和 P4 扩增获得 Overlap PCR 所需的上游片段和下游片段 F1，F2。采用 TIANGEN 公司的胶回收试剂盒、按照说明书指示回收目标片段。

利用 Overlap PCR 技术由模板 F1 和 F2、引物 P1 和 P4 所获得的 *tatABCD* 缺失片段 F1F2。采用 TIANGEN 公司的胶回收试剂盒回收目标片段。

2) 构建自杀工具质粒

将 pDMK 载体多克隆位点的 BglII 位点和 SphI 位点切开后，将目的片段 F1F2 与切割后的质粒用 T4 DNA 连接酶 16℃连接过夜。$CaCl_2$ 转化法转化 *Escherichia coli* SM10 *λpir*，在氯霉素和卡那霉素平板上筛选得到转化有质粒载体 pDMKΔtatABCD 的阳性克隆。

3) 接合

将携带有 pDMKΔtatABCD 质粒的 SM10 *λpir* 按体积比 4 比 1 的比率与野生菌株 EIB202 混合离心，去除上清液，用 10 微升新鲜 LB 培养基重悬沉淀。将 0.22 微米灭菌后的亲水性滤膜平整铺放在新鲜半固体 LB 培养基上，取出全部菌悬液点置于亲水滤膜中央。37℃培养 24 小时后，用 0.2 M 的 $MgCl_2$ 将亲水性滤膜上的菌落洗脱，涂布于卡那霉素、多粘菌素双重抗性平板。

4) 两轮筛选获得 *tatABCD* 基因缺失突变株克隆

如图 2 所示，自杀质粒 pDMKΔtatABCD 根据同源重组原理插入到基因组

上 *tatABCD* 基因簇中。利用卡那霉素、多粘菌素双重抗性平板筛选，及以 P1/P4 为引物的 PCR 扩增鉴定 *tatABCD* 基因插入了缺失了 *tatABCD* 的 F1F2 片段而失活的克隆。接着，在 10% (w/v)的蔗糖 LB 半固体培养基平板上，利用 pDMK 上编码的 SacB 蛋白可反向筛选获得发生第二次同源重组的菌株。以引物 *tatABCD-de*F/R 通过 PCR 验证可获得缺失突变菌株，其中一个克隆命名为 EIBAV11092701，于 2011 年 9 月 29 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏号 CCTCC M 2011338。

(二) *tatABCD* 基因缺失及质粒消除菌株的构建

1) 如图 3 所示，利用引物 catA-P1(GGAAGATCTTCTTTACCAAGCACAT，SEQ ID NO: 7)，catA-P2(ACATGCATGCGCTCAGGTTAAATTAAAGGG，SEQ ID NO: 8)，以迟钝爱德华氏菌野生毒株 EIB202 中的质粒 pEIB202 为模板，扩增获得相应的基因片段 CAT（编码氯霉素抗性基因片段）。并按照(一)中所描述方法，连接构建于 pDMK 上，获得质粒 pDMKCATIII。

2) 通过(一)中所描述接合的方法，将质粒 pDMKCATIII 从 SM10 *λpir* 中接合转移至上述获得的 EIBAV11092701 受体菌株中。根据同源交换原理，质粒 pDMKCATIII 插入到菌株 EIBAV11092701 中的内源性质粒 pEIB202 中对应片段上，于 41℃培养 24 小时后重新接种至不添加抗生素的培养基中培养，重复 3 次。利用 SacB 筛选标记，在 10% (w/v)的蔗糖 LB 平板上筛选获得 SacB 阴性的菌株，利用引物 C6-P1(CGGCAGCTTCAATAACCA，SEQ ID NO: 9)，C6-P2(GGAACTCCGTAACGTCGAA，SEQ ID NO: 10)进行 PCR 验证，质粒抽提验证确定其为质粒消除菌株 Δ*tatABCD* Δplas。

(三) 减毒疫苗株 EIBAV11092801 的构建

在迟钝爱德华氏菌 Δ*tatABCD* Δplas 基础上构建定向缺失 *eseBCD* 和 *escA* 基因的突变株，利用下列扩增引物：

P5：GGAAGATCTCGCCTTTCACACGTTACAGCAAGAG，SEQ ID NO: 11，

P6：GCTGGGCATCCGATTAGCCACCTGCTGGGA，SEQ ID NO: 12，

P7：CAGGTGGCTAATCGGATGCCCAGCAAAAGA，SEQ ID NO: 13，

P8：ACATGCATGCCCTGCGACTGACGCGACATGTCATT，SEQ ID NO:

14.

TTSS-deF：CCTGTTCAATACCGCACGGCGTTTT，SEQ ID NO: 15，

TTSS-deR：TGCGGCCATCCATCATATCGCTCGG，SEQ ID NO: 16。

首先分别用 P5 和 P6、P7 和 P8 扩增获得 Overlap PCR 所需的上游片段和下游片段 F3，F4。回收各片段后，利用 Overlap PCR 技术与引物 P5 和 P8 一起反应获得 TTSS 缺失片段 F3F4。并按照(一)中所描述，连接构建于 pDMK 上，获得质粒 pDMKΔTTSS。

将携带有 pDMKΔTTSS 质粒的 SM10 *λpir* 按体积比 4 比 1 的比率和迟钝爱德华氏菌 Δ*tatABCD* Δplas 混合离心，按照(一)中所描述，利用卡那霉素、多粘菌素双重抗性平板筛选，及以 P5/P8 为引物的 PCR 扩增可鉴定获得 TTSS 基因因插入 F3F4 而失活的克隆。随后在 10%蔗糖 LB 半固体培养基平板上，利用 pDMK 上编码 SacB 可反向筛选获得发生第二次同源重组的菌株。以引物 TTSS-deF/TTSS-deR 通过 PCR 验证获得的缺失突变菌株，其中一个克隆命名为 EIBAV11092801。于 2011 年 9 月 29 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏号 CCTCC M 2011339。

(四) *tatABCD*$^+$回补株的构建

在 Δ*tatABCD* 突变株的基础上，利用引物 *tatABCD*-comF(CCGGAATTCGCTGGGTGCCGCCGGATACCAATG，SEQ ID NO: 17)和引物 *tatABCD*-comR(ACGCGTCGACTCGCGGAACGGACCGTAGTAGCAAG，SEQ ID NO: 18)，以 *E. tarda* EIB202 (CCTCC M 208068)基因组为模板扩增含有 *tatABCD* 基因启动子区域及其完整开放阅读框的基因序列，随后对该目的片段进行测序分析。将此片段与回补质粒 pMMBK 通过 *EcoR*I 和 *Sal*I 双酶切后用 T4 DNA 连接酶 16℃连接过夜，$CaCl_2$ 转化法转化 *Escherichia coli* SM10 *λpir*，在氯霉素和卡那霉素平板上筛选得到转化有质粒载体 pMMBKtatABCD(该质粒含 *tatABCD* 片段)的阳性克隆。通过(一)中所描述接合的方法，将质粒 pMMBKtatABCD 从 SM10 *λpir* 中接合转移至上述获得的 Δ*tatABCD* Δplas 受体菌株中。利用卡那霉素、多粘菌素双重抗性平板筛选，及以 pMMB206-F(CCCCAGGCTTTACACTT，SEQ ID NO: 19)和 pMMB206-R(GCTTCTGCGTTCTGATTT，SEQ ID NO: 20)为引物的 PCR 扩增鉴定获得的回补菌株，将所得回补株克隆命名为 tatABCD+。

实施例 2　减毒活疫苗的制备

(一) 培养基与生理盐水配制：

1)LB 斜面培养基：胰蛋白胨(Difco)10 g/L，酵母浸出物(Merck)5 g/L，NaCl 5 g/L，琼脂 18 g/L，pH 7.5；

2)种子培养基：胰蛋白胨(Difco)10 g/L，酵母浸出物(Merck)5 g/L，NaCl 5 g/L，pH 7.5；

3)发酵培养基：胰蛋白胨(Difco)10 g/L，酵母浸出物(Merck)5 g/L，NaCl 5 g/L，pH 6.8；

4)生理盐水：NaCl 9 g/L，pH 7.2，121℃灭菌 20 分钟。

(二) 疫苗组合物的制备：

取一接种环保存于 LB 斜面培养基上的减毒疫苗株 EIBAV11092801 种子，接种于装有 100 ml 液体 LB 种子培养基的 500 ml 摇瓶，在 28℃下振荡培养(转速 200 转/分钟)。12 小时后，取 5 ml 生长旺盛的菌液(OD_{600} = 4.0 左右)接种于 100 ml 新鲜发酵培养基，28℃培养 12 小时。用无菌生理盐水洗涤 3 次，离心收获菌体(2000×*g*，15 分钟，15℃)，无菌生理盐水稀释成一定浓度悬液(10^2~10^9 CFU/ml)，由此制得含有弱毒株 EIBAV11092801 作为活疫苗的免疫组合物，保藏于 15℃备用。

实施例 3：迟钝爱德华氏菌菌株 EIBAV11092701 的应激及毒力检测

（一）EIBAV11092701 渗透压应激检测

将野生株(EIB202)、*tatABCD* 基因缺失突变株 EIBAV11092701(Δ*tatABCD*)和回补株(*tatABCD*$^+$)过夜培养的 LB 培养液稀释到 OD_{600} = 1.0，然后按照 1%的接种量接种至含有不同 NaCl 浓度(1.5%、3.0%和 3.5%，百分比按 g/100 ml 计)的 LB 培养基中进行培养，通过测定各菌株在不同时间点的生长状况来检测 EIBAV11092701 渗透压应激能力(图 4)。

结果显示，迟钝爱德华氏菌野生毒株和 EIBAV11092701 菌株在低盐(1.5% NaCl)条件下的生长特征没有差异，而在高盐浓度下(3.0% 和 3.5% NaCl)，虽然迟钝爱德华氏菌野生毒株在稳定期的菌体浓度相较于低盐情况有所下降，但是未出现生长延滞的现象；而 EIBAV11092701 菌株的生长则出现明显的延滞，生长速率和最终的菌体浓度显著下降，而且其生长受抑制的程度随着 NaCl 浓度的提高而增强。可见，Tat 系统对于迟钝爱德华氏菌在高盐环境下的生长具

有重要的作用。

（二）EIBAV11092701 在不同盐浓度下的生长维持状况

上面的结果显示EIBAV11092701在高盐浓度下相较于迟钝爱德华氏菌野生毒株的菌体浓度显著下降。为了弄清其生长抑制是否是由于菌体在高盐浓度下的裂解等不可培养因素所引起，进一步检测了野生株和突变株在不同盐浓度下可培养细胞的数目。将过夜培养的野生株(EIB202)和突变株EIBAV11092701(Δ*tatABCD*)分别接种至50 ml含有不同盐浓度(2.5%、3%、3.5%、4% NaCl)的人工海水中进行培养，培养温度为28°C，每隔一定时间进行取样，进行一定的浓度梯度稀释后取100 μl样品涂布至LB固体培养基上，于30°C培养48小时后进行菌落计数(图5A)。当平板上菌落数少于1时认定为不可培养的。

结果显示，在28°C培养温度条件下，在所检测的盐浓度范围内EIBAV11092701菌株均出现生长受损的现象，其可培养菌落数目明显低于野生株，且下降速度明显更快。此外，EIBAV11092701菌株在所检测的盐浓度条件下维持时间相对野生毒株减少了3-5天。可见，Tat系统对于迟钝爱德华氏菌在高盐环境下的生长具有重要的作用。

（三）EIBAV11092701在不同温度和不同盐度下的生长维持状况

由于海水环境在不同的季节不仅在盐浓度上有一定范围的波动，其水体温度也会发生一定的改变，因此进一步检测了迟钝爱德华氏菌株在上述盐浓度范围并且在不同温度条件培养下的生长状况。分别选取了16°C和10°C，检测了野生株和Tat突变株的生长状况(图5B和C)。

结果显示野生株和EIBAV11092701在检测温度16°C和10°C下的盐度生长受限情况与28°C时的情况基本一致。然而EIBAV11092701相较于野生毒株其生长受限的程度更为明显。例如，10°C时，突变株EIBAV11092701在检测盐浓度范围(2.5%、3%、3.5%、4% NaCl)下的维持时间比野生株EIB202缩短4-13天。

这些结果表明Tat系统在高盐应激方面扮演重要角色，可以利用Tat缺陷株在低盐环境(如鱼体中)能够稳定存在而在高盐环境(海水环境中)不能稳定存在的盐度限制特性构建适用于海水环境的生物学屏障的减毒活疫苗，由此提高减毒活疫苗的环境生物安全性。

（四）EIBAV11092701 的致病力检测

进一步用健康大菱鲆考察 EIBAV11092701 菌株的致病力，检测指标为半致死剂量 LD_{50}。试验用鱼先置于洁净水槽适应养殖 1 周，以剔出不正常个体。在感染试验前，再将健康试验用鱼养殖于 10 L 感染试验水槽，继续喂养 1 周，每槽养殖 10 尾(平均体长 11 ~ 12 cm，体重 30 g)。试验水槽每天使用无菌海水替换 2/3 体积养殖水，水温 16℃，上下波动 2℃。于 12000 *g* 离心收集各菌株的过夜培养物，然后用生理盐水洗涤 3 次以除去残留的培养基，将菌体用生理盐水进行重悬，同时将密度梯度调整至 10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8 和 10^9 CFU/ml，并采用平板计数的方式计算菌液中菌体的数量。将实验动物进行分组，每组 3 个平行水槽，每槽 10 尾，实验鱼用 MS-222 溶液(80 mg/L)进行麻醉，采用背部肌肉注射的方式进行人工感染，每组按照 10^1、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7 和 10^8 CFU/尾注射动物。对照组则以同样的方式注射同样剂量生理盐水。注射完成后，将感染后的试验动物正常饲养，观察 15 天内鱼体的感染情况，记录每天实验动物死亡数，实验结束后用过量的 MS-222 溶液(200 mg/L)杀死实验用鱼。用 Reed-Muench 法计算各菌株的半致死剂量(LD_{50})，根据实验动物体重换算成 CFU/g 体重(见表 1)。其计算公式如下：

$$LD_{50} = 10^{[Xm - i(\sum P - 0.5)]}$$

其中：

Xm：最大剂量的对数值

i ：相邻两组剂量对数值之差

P：各组动物死亡率，用小数表示(如死亡率为 80％应写成 0.8)

∑P：各组动物死亡率之总和

表 1. 迟钝爱德华氏菌野生株和突变株 EIBAV11092701 对大菱鲆的半致死剂量 LD_{50}

菌株	LD_{50} (CFU/g)
EIB202	4.75×10^2
EIBAV11092701	2.5×10^3

结果显示 EIBAV11092701 在以大菱鲆为动物模型时，其毒力低于迟钝爱德华氏菌野生毒株 EIB202，适于作为构建减毒疫苗的出发菌株。

实施例 4：迟钝爱德华氏菌减毒株 EIBAV11092801 的致病力及免疫保护率评价

(一)以大菱鲆为试验动物的注射给药毒力测试

用健康大菱鲆考察 EIBAV11092801 菌株的致病力，检测指标为半致死剂量 LD_{50}。试验用鱼先置于洁净水槽适应养殖 1 周，以剔出不正常个体。在感染试验前，再将健康试验用鱼养殖于 10 L 感染试验水槽，继续喂养 1 周，每槽养殖 10 尾(平均体长 11 ~ 12 cm，体重 30 g)。试验水槽每天使用无菌海水替换 2/3 体积养殖水，水温 16℃，上下波动 2℃。于 12000 *g* 离心收集各菌株的过夜培养物，然后用生理盐水洗涤 3 次以除去残留的培养基，将菌体用生理盐水进行重悬，同时将密度梯度调整至 10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9 和 10^{10} CFU/ml，并采用平板计数的方式计算菌液中菌体的数量。将实验动物进行分组，每组 3 个平行水槽，每槽 10 尾，采用背部肌肉注射的方式进行人工感染，每组按照 10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8 和 10^9 CFU/尾注射动物。对照组则以同样的方式注射同样剂量生理盐水。注射完成后，将感染后的试验动物正常饲养，观察 15 天内鱼体的感染情况，记录每天实验动物死亡数，用 Reed-Muench 法计算各菌株的半致死剂量(LD_{50})，根据实验动物体重换算成 CFU/g 体重(见表 2)。

表 2. 迟钝爱德华氏菌野生株和减毒株 EIBAV11092801 对大菱鲆的半致死剂量 LD_{50}

菌株	LD_{50} (CFU/g)
EIB202	4.75×10^2
EIBAV11092801	高于 5.0×10^8

结果显示 EIBAV11092801 的毒力显著低于野生毒株 EIB202，在所检测的感染剂量范围内所引起的死亡数均未达到 50%，减毒效果非常明显。

（二）以大菱鲆为试验动物的注射给药免疫保护试验

以 5×10^3 CFU/g 剂量腹腔注射免疫健康大菱鲆，试验所用大菱鲆随机分为 3 组，每组 3 个平行水槽，44 尾/槽。将制备的减毒活疫苗采用腹腔注射方式免疫。免疫期为一个月，每天观察实验动物健康状况，见表 3。在免疫 1 个月后，将 EIB202 以 1×10^2 CFU/g 剂量对免疫动物进行背部肌肉注射方式攻毒，连续考察 3 周，统计累计死亡率并计算相对免疫保护力(表 3)。

其中，按下列公式计算免疫保护率：相对免疫保护率（RPS）%=(对照组死亡率–免疫组死亡率%)/对照组死亡率×100%。

表 3. 迟钝爱德华氏菌减毒株 EIBAV11092801 的免疫保护率评价

菌株	免疫剂量 (CFU/g)	免疫尾数	攻毒后死亡尾数	累计死亡率 (%)	RPS%
EIBAV11092801	5×10^3	132	24	18.19	81.81
生理盐水	5×10^3	120	120	100	/
生理盐水且无攻击对照	/	120	0	0	/

由表 3 的结果可知用 EIBAV11092801 减毒株具有较好的免疫保护力，相对免疫保护率 RPS 在 80%以上，可以有效地抵抗迟钝爱德华氏菌野生毒株的感染。

（三）以大菱鲆为试验动物的浸泡给药免疫保护试验

进一步考察了 EIBAV11092801 减毒株以浸泡给药方式的免疫保护效率。将试验大菱鲆随机分为 4 组，每组 3 个平行水槽，40 尾/槽。浸泡免疫是将制备好的疫苗原液用无菌海水稀释成 10^6 CFU/ml 或 10^8 CFU/ml，放入浸泡用无菌空水槽至 10 L，然后将各组试验大菱鲆依次浸泡处理，浸泡时间控制在 15-120 分钟之间。对照组不做任何处理。免疫 4 周后将各组免疫大菱鲆用迟钝爱德华氏菌野生毒株活菌(背部肌肉注射感染 1×10^2 CFU/g)进行人工感染攻毒。在 3 周内观察统计对照组和免疫组死亡数，计算每组的免疫保护率(见表 4)。

表 4. 迟钝爱德华氏菌减毒株 EIBAV11092801 浸泡免疫的免疫保护力评价

菌株	浸泡浓度 (CFU/ml) 时间	免疫尾数	攻毒后死亡尾数	累计死亡率 (%)	RPS%
EIBAV11092801	10^8 15 min	120	40	33.33	65.5
EIBAV11092801	10^6 15 min	120	48	40.0	58.6
生理盐水组		120	116	96.7	/
空白对照组		120	0	0	/

从上述数据可以看出，该减毒疫苗具有良好的抗迟钝爱德华氏菌感染防治效果，注射免疫 4 周后的免疫保护率高于 50%，而没有接种疫苗的大菱鲆死亡率接近 100%。浸泡给药剂量在 10^6-10^8 CFU/ml 范围内表现十分稳定的给药安全性。和注射给药效果相比，浸泡免疫表现出基本一致的良好免疫效果，说明本发明疫苗可方便地通过浸泡给药方式获得高免疫保护率。

实施例 5：迟钝爱德华氏菌减毒株 EIBAV11092801 在不同盐浓度下的维持状况检测

为了检测 EIBAV11092801 在不同盐浓度下可培养细胞的数量，将过夜培养的迟钝爱德华氏菌减毒株 EIBAV11092801 接种至 50 ml 新鲜的含有不同盐浓度(2.5%、3.5%和 4% NaCl)人工海水中进行培养。然后将 100 μl 样品涂布至 LB 平板培养基中，在 30°C 培养 48 小时。当平板上长出的菌落少于 1 个时认定为不可培养的。结果表明，8-9 天后，在海水环境(2.5%以上盐浓度)中检测不到 EIBAV11092801 菌落。

综上，本发明的减毒活疫苗株在养殖鱼类模型上具有非常良好的抗迟钝爱德华氏菌免疫保护效果，同时消除了传统减毒活疫苗普遍存在的潜在环境和产品安全风险，是一种安全、有效、经济的疫苗。

以上，通过实施例示例性的讲解了本发明的实施方式。很显然，在此基础上可以作出各种修改和变换，这些修改后变换明显符合本发明的精神和范围。因此，说明书和附图应被认为是说明性的而非限制性的。

PCT

0-1	PCT/RO/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	PCT-SAFE 版本 3.51.053.229 MT/FOP 20120101/0.20.5.19
0-2	国际申请号	**PCT/CN2012/076961**
0-3	申请人或代理人的档案号	122377PCWO

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	6-7
1-2	行号:	16-19;1-3
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	CCTCC 中国典型培养物保藏中心
1-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码:430072, Hubei (CN)。
1-3-3	保藏日期	2011年 9月 29日 (29.09.2011)
1-3-4	保藏号	CCTCC M 2011338;M 2011339
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	受权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	受权官员	

权 利 要 求 书

1. 一种迟钝爱德华氏菌突变株，其特征在于其 *tatABCD* 基因失活因而不表达 TatABCD 蛋白。

2. 如权利要求 1 所述的迟钝爱德华氏菌突变株，其特征在于 *tatABCD* 基因被缺失。

3. 如权利要求 1 所述的迟钝爱德华氏菌突变株，它是保藏号为 CCTCC M 2011338 的迟钝爱德华氏菌 EIBAV11092701。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的迟钝爱德华氏菌突变株，其迟钝爱德华氏菌内源性质粒 pEIB202 缺失。

5. 如权利要求 1 所述的迟钝爱德华氏菌突变株，其特征还在于其 *eseBCD* 和 *escA* 基因失活因而不表达 EseBCD 和 EscA 蛋白，并且不含迟钝爱德华氏菌野生株的内源性质粒 pEIB202。

6. 如权利要求 5 所述的迟钝爱德华氏菌突变株，其特征在于 *eseBCD* 和 *escA* 基因被缺失。

7. 如权利要求 6 所述的迟钝爱德华氏菌突变株，它是保藏号为 CCTCC M 2011339 的迟钝爱德华氏菌 EIBAV11092801。

8. 一种免疫组合物，包含权利要求 1 至 7 中任一项所述的迟钝爱德华氏菌突变株作为免疫原性组分。

9. 如权利要求 8 所述的免疫组合物，其特征在于，所述迟钝爱德华氏菌突变株的浓度为 10^3-10^9 CFU/ml。

10. 一种防治鱼类爱德华氏菌病的方法，包括给予鱼类权利要求 1 至 7 中任一项所述迟钝爱德华氏菌突变株或权利要求 8-9 中任一项所述免疫组合物的步骤。

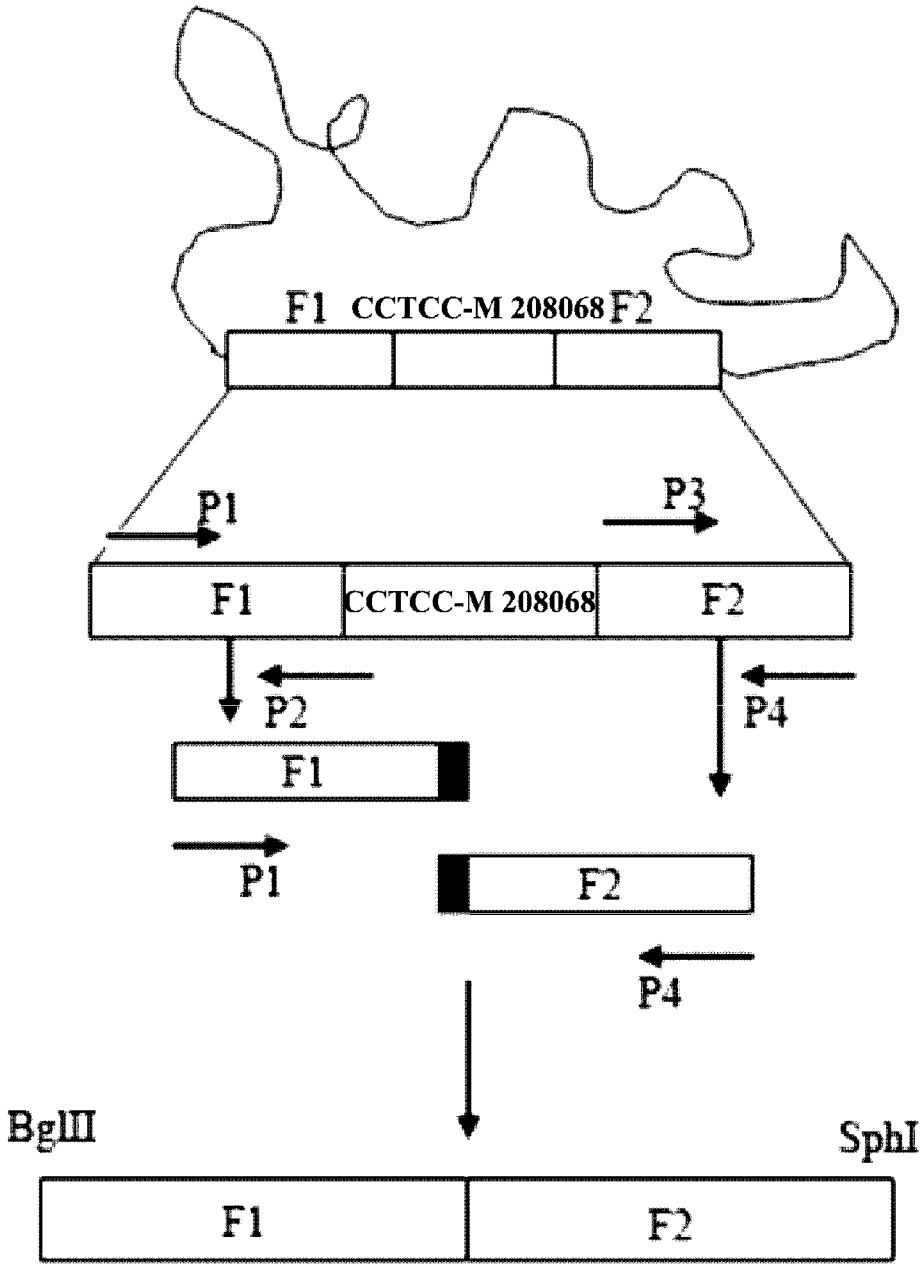
F1
CCTCC-M 208068
F2
P1
P3
F1
CCTCC-M 208068
F2
P2
P4
F1
P1
F2
P4
BglII
SphI
F1
F2

图 1

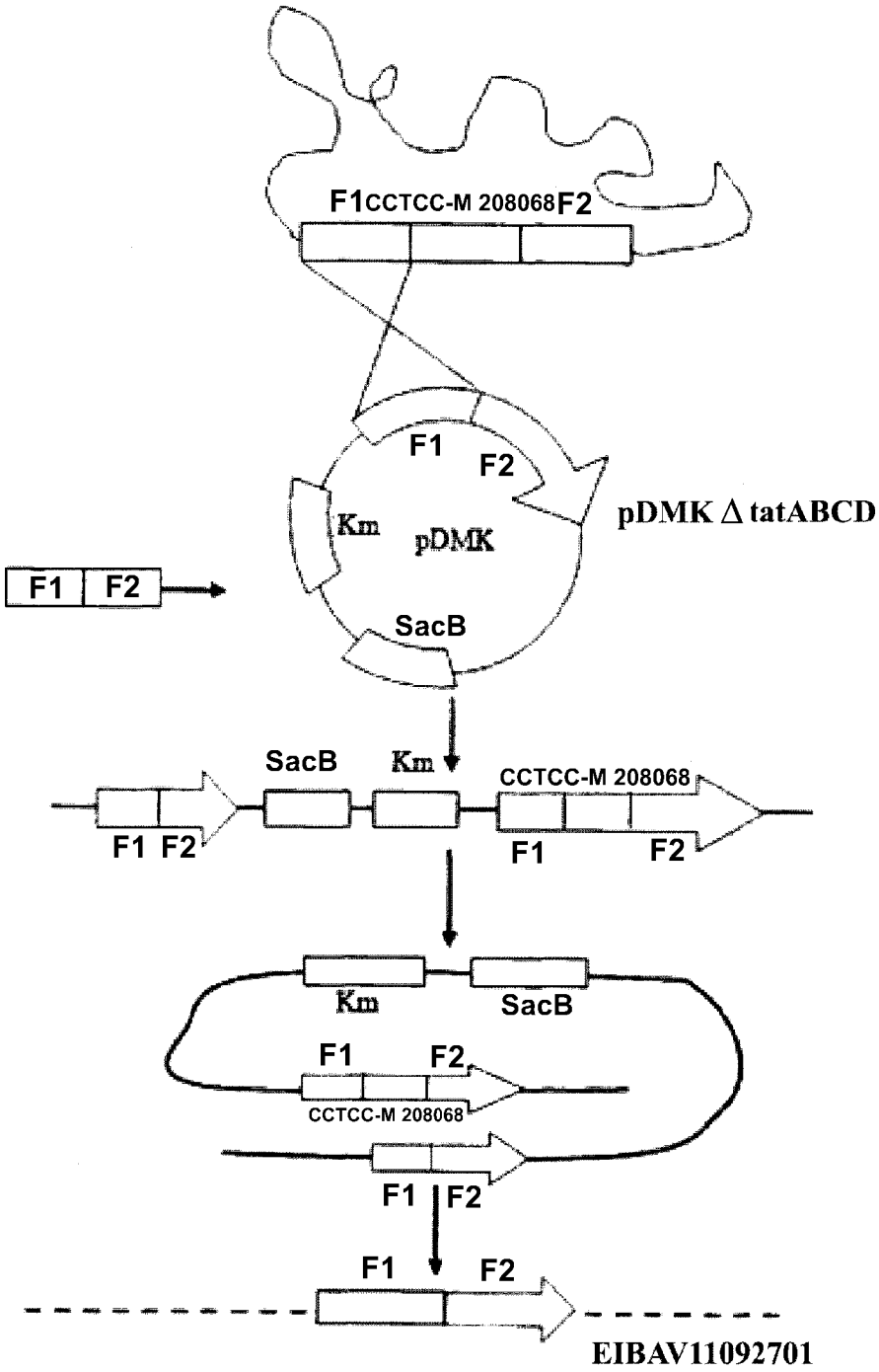
F1CCTCC-M 208068F2
F1
F2
Km
pDMK
pDMK Δ tatABCD
F1
F2
SacB
SacB
Km
CCTCC-M 208068
F1
F2
F1
F2
Km
SacB
F1
F2
CCTCC-M 208068
F1
F2
F1
F2
EIBAV11092701

图 2

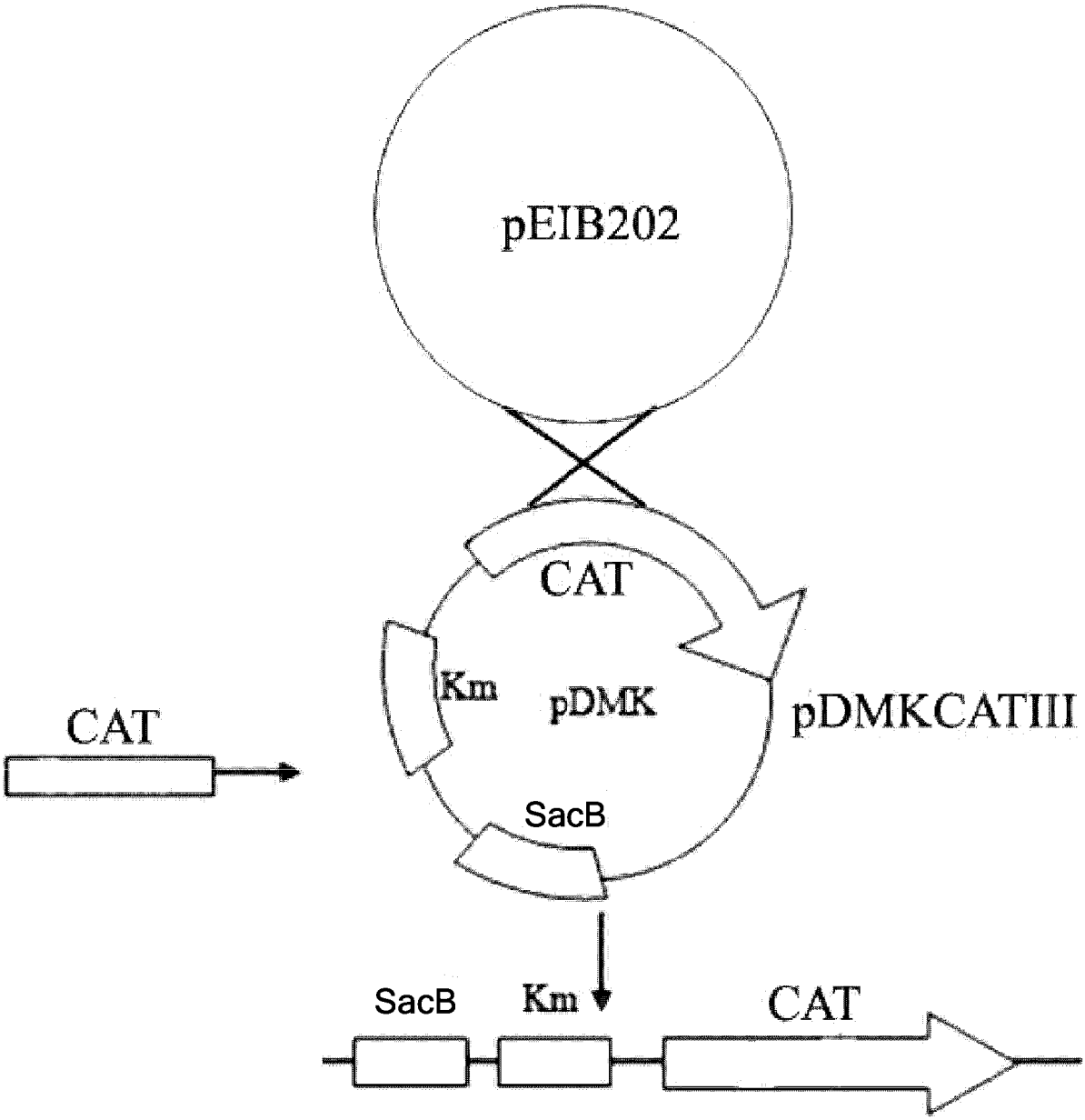

图 3

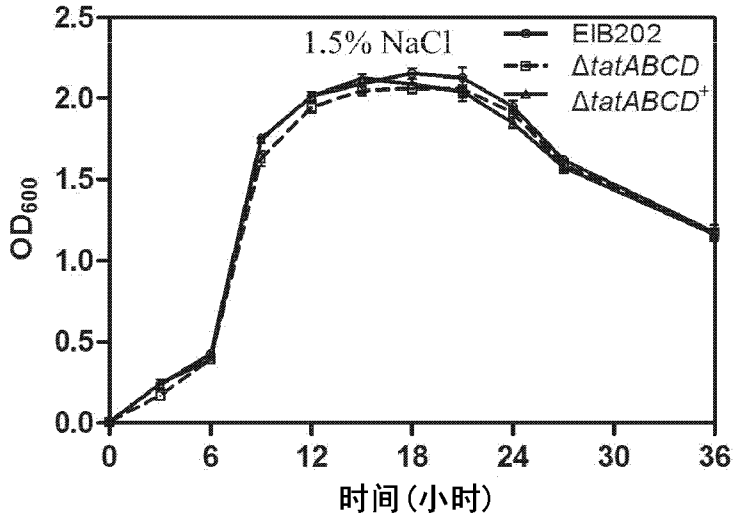
1.5% NaCl
EIB202
ΔtatABCD
ΔtatABCD+
OD600
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
6
12
18
24
30
36
时间(小时)

图 4A

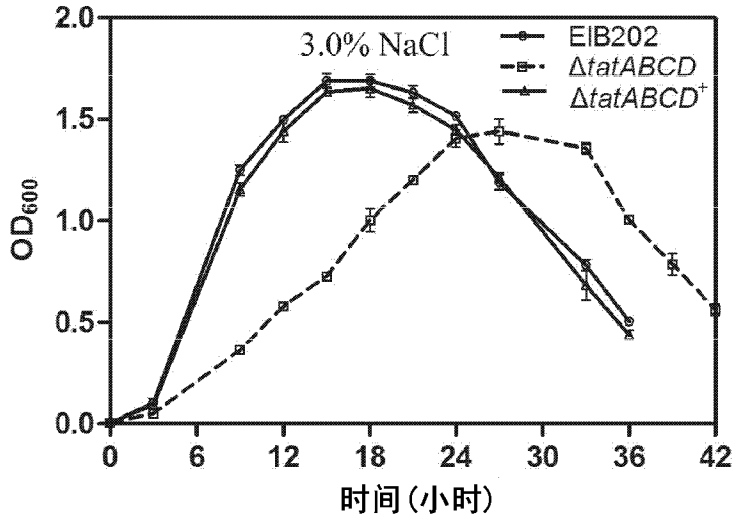
3.0% NaCl
EIB202
ΔtatABCD
ΔtatABCD+
OD600
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
6
12
18
24
30
36
42
时间(小时)

图 4B

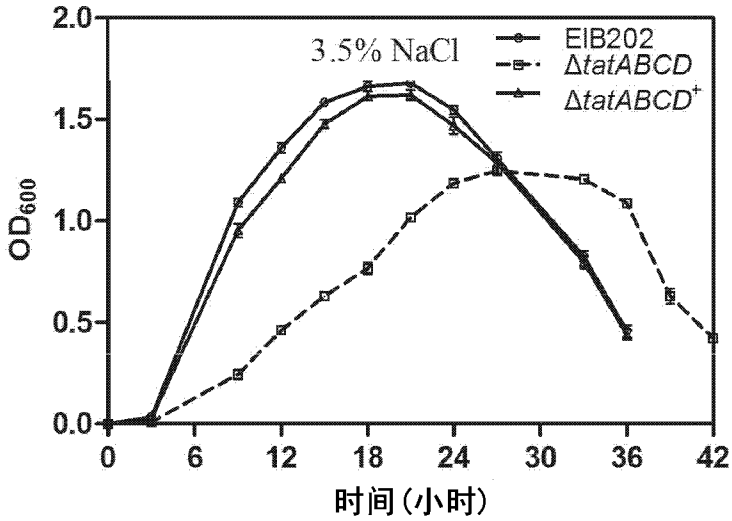
3.5% NaCl
EIB202
ΔtatABCD
ΔtatABCD+
OD600
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
6
12
18
24
30
36
42
时间(小时)

图 4C

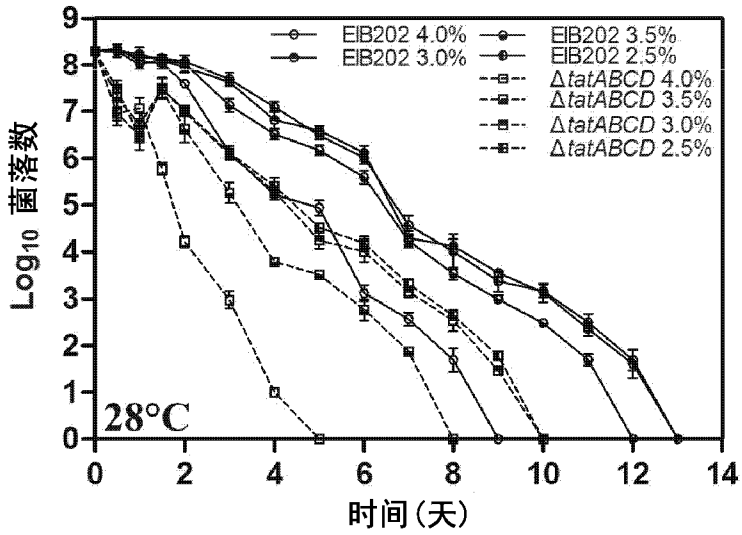
EIB202 4.0%
EIB202 3.5%
EIB202 3.0%
EIB202 2.5%
ΔtatABCD 4.0%
ΔtatABCD 3.5%
ΔtatABCD 3.0%
ΔtatABCD 2.5%
Log10 菌落数
28°C
时间(天)

图 5A

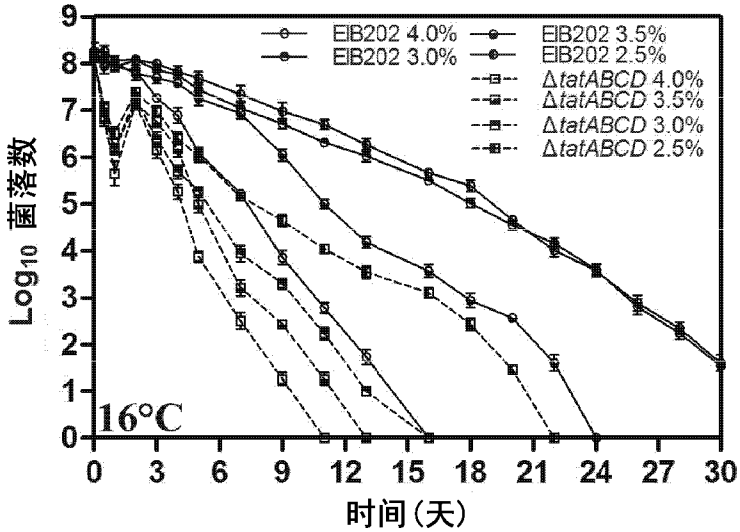
EIB202 4.0%
EIB202 3.5%
EIB202 3.0%
EIB202 2.5%
ΔtatABCD 4.0%
ΔtatABCD 3.5%
ΔtatABCD 3.0%
ΔtatABCD 2.5%
Log10 菌落数
16°C
时间(天)

图 5B

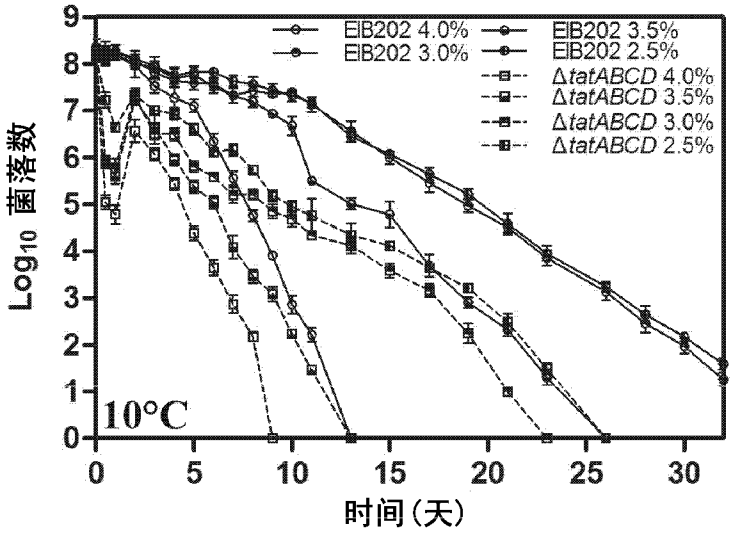
EIB202 4.0%
EIB202 3.5%
EIB202 3.0%
EIB202 2.5%
ΔtatABCD 4.0%
ΔtatABCD 3.5%
ΔtatABCD 3.0%
ΔtatABCD 2.5%
Log10 菌落数
10°C
时间(天)

图 5C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/076961

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N, A61K, A61P, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Data bases: CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase), CNKI

Search terms: twin arginine, edwardsiella tarda, twin arginine translocation, tata, tatb, tatc, tatd, tatabcd

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101629149 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 20 January 2010 (20.01.2010), see the whole document	1-9
A	CN 101705198 A (INSTITUTE OF OCEANOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 12 May 2010 (12.05.2010), see the whole document	1-9
A	CN 101974472 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 16 February 2011 (16.02.2011), see the whole document	1-9
A	WANG, Y.M. et al., Genetic relationships of *Edwardsiella* strains isolated in China aquaculture revealed by rep-PCR genomic fingerprinting and investigation of *Edwardsiella* virulence genes, JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, ISSN 1364-5072, vol. 111, no. 6, pages 1337-1348, 31 December 2011 (31.12.2011), see the whole document	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 February 2013 (07.02.2013)	**07 March 2013 (07.03.2013)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **PAN, Junyu** Telephone No.: (86-10) **62411086**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/076961

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claim 10 relates to a method of treatment of the animal body, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/076961

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101629149 A	20.01.2010	CN 101629149 B	03.08.2011
CN 101705198 A	12.05.2010	CN 101705198 B	23.05.2012
CN 101974472 A	16.02.2011	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076961

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21 (2006.01) i

C12N 1/36 (2006.01) i

A61K 39/02 (2006.01) i

A61P 31/04 (2006.01) i

A61P 37/04 (2006.01) i

C12R 1/01 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/076961

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC：C12N,A61K,A61P,C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

数据库：CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE(Biosis, medline, Embase), CNKI;

检索词：迟钝爱德华，双精氨酸，edwardsiella tarda，twin arginine translocation，tata，tatb，tatc，tatd，tatabcd

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN101629149A（华东理工大学），20.1 月 2010（20.01.2010），参见全文	1-9
A	CN101705198A（中国科学院海洋研究所），12.5 月 2010（12.05.2010），参见全文	1-9
A	CN101974472A（华东理工大学），16.2 月 2011（16.02.2011），参见全文	1-9
A	WANG, Y.M. et al., Genetic relationships of *Edwardsiella* strains isolated in China aquaculture revealed by rep-PCR genomic fingerprinting and investigation of *Edwardsiella* virulence genes, Journal of Applied Microbiology, ISSN1364-5072, 第 111 卷, 第 6 期，第 1337-1348 页，31.12 月 2011（31.12.2011），参见全文	1-9

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
07.2 月 2013（07.02.2013）	**07.3 月 2013 (07.03.2013)**
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 潘俊宇 电话号码：(86-10) **62411086**

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/076961

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第 1 页第 2 项)

根据条约第 17 条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求：10

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求 10 的主题涉及动物体的治疗方法，属于 PCT 实施细则第 39.1 规定的无须检索的情况。

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，

具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第 1 页第 3 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。

具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/076961

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101629149A	20.01.2010	CN101629149B	03.08.2011
CN101705198A	12.05.2010	CN101705198B	23.05.2012
CN101974472A	16.02.2011	无	

A. 主题的分类

C12N1/21(2006.01)i

C12N1/36(2006.01)i

A61K39/02(2006.01)i

A61P31/04(2006.01)i

A61P37/04(2006.01)i

C12R1/01(2006.01)n