

生物工程防治鱼类微生物病害产业化探讨

DISCUSSION OF BIOENGINEER INDUSTRIALIZATION ON PREVENTION AND CURE FISH DISEASES OF MICROORGANISMS

李新辉 郑光明 赖子尼 邬国民

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

Li Xinhui Zheng Guangming Lai Zini Wu Guoming

(Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

关键词 生物工程, 鱼类, 病害防治

KEYWORDS Bioengineer, Fish, Prevention and Cure diseases

前 言

八十年代中期以来,我国鱼类生物工程的热点是将生长激素(GH)基因转入各种鱼类,至九十年代,已有许多学者从事转基因鱼研究,其中朱作言等人的研究最为出色,他们最早获得外源基因在受体鱼中表达的结果^[1],所建立的转基因模型理论,对当前转基因育种具有一定指导意义^[2],近几年加强了克隆鱼类基因的工作,主要集中在GH和抗冻等相关基因^[3,4],尚未能实现产业化。而生物工程在抗逆性研究方面,忽视了针对病原微生物进行鱼类病害防治的工作,我们认为分子遗传学的基础是建立在微生物研究的基础上,许多微生物遗传背景研究得很清楚,引用这些技术研究病原微生物的致病性基因和免疫原性基因,制备疫苗和快速检测试剂盒,将给鱼类病害防治,实现生物工程技术产业化带来帮助。

微生物病害防治作为鱼类生物 工程产业化突破口的可能性

鱼病是阻碍渔业生产的重要制约因素,多年来对不同病原进行了广泛的研究,包括病毒、细菌、真菌、寄生虫等,对其致病机理以及防治方面的研究取得了显著的成绩,尽管如此生物工程技术在鱼类疾病防治研究上比较落后,与人类医学和畜牧业领域相比存在一段很大差距,目前医学和畜牧业领域已经有多种基因工程疫苗在研制以及投入市场,在形

收稿日期: 1993-12-20。

成生物工程产业化方面做出了表率, 因此, 借鉴和引用这些成果是我们尽快缩短差距的最好途径。

事实上, 同科属不同种的病原之间, 在遗传本质上有很大的同源性, 在免疫学方面也有许多相似处, 如弧菌 (*Vibrio*) 中, TDH 是重要的毒力因子, 能够引起特殊的溶血现象 (Kp)。分子生物学研究证明 TDH 及其类似的基因广泛存在于多种弧菌中^[5], 这是因为毒素基因与一段插入序列 (IS) 相联构成转移复合物在弧菌中广泛传播。已知副溶血弧菌在种系进化过程中基因突变等造成 TDH 的轻微差异, 形成了一个 TDH 基因家族, 该家族有 9 种不同型, 分析显示所有引起特殊 Kp 现象的菌都带有两种拷贝 TDH 基因, 一种在 1.3kb HindⅢ片段内, 命名为 TDH₁, 另一种在 2.5kb HindⅢ片段内, 命名为 TDH₂, 而 Kp 弱阴性和 Kp 阴性的菌株只含有一种拷贝的 TDH 基因, 位于 2.8kb HindⅢ片段内称为 TDH₃, 这三种状态的基因由染色体携带, 另外一种叫 TDH₄ 的基因由质粒携带, 它存在于另一种副溶血弧菌的 Kp 阴性菌中, 所有这些基因在结构上高度同源, 区别主要表现在起始区, SD 区和 3'末端, 在编码区四种致病性 TDH 基因中只有 4-12 碱基差异。

资料表明, 将各种拷贝的 TDH 基因克隆到大肠杆菌体内均可表达出溶血毒素活性物质, 但是活性比较低, 目前认为这些仅是环境因子影响基因表达造成的结果, 因而会引起基因阳性而 Kp 阴性现象。氨基酸测序结果表明, 各种 TDH 毒素的活性部分均由 189 个氨基酸残基组成, 其中 173 个完全相同, 其余部分可有一个或多个氨基酸不同, 纯化各种 TDH 基因产物表明, TDH₂ 毒素是产量最大的细胞外 Kp 阳性溶血毒素, 这表明非编码区调控部分的重要性, 有些菌不表现毒性是由于基因的关闭或表达量少, 并不是结构基因内部的编码差异所引起。免疫原性方面, 几种基因产物完全一致, 用目前的免疫学方法无法区别。在同种属之间许多相关基因有很大的同源性, 弧菌方面是这样, 其它生物也是这样^[6], 这些遗传学方面的通性是许多应用遗传学研究的基础。

在医学领域, 许多致病性微生物已经进行了基因水平的研究, 参照这些研究, 选取水产养殖业中危害比较大的病原, 这样鱼类病害生物工程技术防治方面的研究是有理论依据的, 用这样的方式, 针对几种主要鱼类病害研究检测技术和基因工程疫苗, 通过努力在短期内获得成功是可能的。

病害防治中应用生物工程技术的前景

从目前的研究看, 影响鱼类养殖的病原微生物很多, 但危害性比较大的已知病原仅集中在几种病毒以及细菌和寄生虫病方面, 并有一些成功的组织疫苗或细菌疫苗, 在控制鱼类传染病方面起到了一定的作用。但是由于常规的疫苗是随机突变或试剂诱变使病原体毒力致弱而产生的, 侵染宿主后便有可能发生毒力返强而致病。因此, 弱毒疫苗需要对细胞株进行大量的弱化筛选, 工作量相当大, 即使这样仍随时存在毒力返强的可能, 加上许多病毒还无法离体培养, 造成制备疫苗的困难; 而灭活疫苗必须依赖于病原侵染的鱼体制备, 所以, 在材料来源和成本因素上局限了疫苗的使用范围。基因工程疫苗是通过分离病原中具有免疫保护性的抗原基因, 在体外表达系统中生产特定抗原蛋白制作疫苗。它的优点在于抗原专一, 避免了常规疫苗将整个病原基因组转入接种鱼, 而造成可能的毒源传播

和危害,便于应用发酵技术进行工厂化生产。具有价格低廉、稳定性好等优点。综观病原微生物方面的研究以及鱼类生物技术研究的现有水平,我们认为产业化方面的突破口应该选取防治危害性比较大的细菌或病毒病害。

草鱼 (*Crenopharyngodon idellus*) 是我国主要的养殖鱼类,具有生长快,养殖范围广,产量高的特点,是养殖者和消费者喜爱的品种,但是当年草鱼受出血病的威胁,病季常造成大面积的死亡(当年草鱼的死亡率达 30~50%)其损失直接影响养殖业经济的发展,如果能研制有效的基因工程疫苗,以广东省 1992 年草鱼产量 24.78 万吨计算,若每尾 1.5kg 合计约 1652 万尾,其中 50% 用售价为 0.01 元/尾的疫苗,市场潜力为 82.6 万元/年,生产疫苗的成本约为 12 万元(不包括固定资产投资成本,其中支付生产工人工资 2 万元/年,水电、房租计 5 万元/年,药品试剂 5 万元/年),即每年有毛利约 60~70 万元。如果在全国推广使用,其效益更可观。事实上每尾草鱼增加 0.1~0.2 元的疫苗使用成本,养殖者是能够接受的。通过疫苗的使用不但能保障养殖者的利益,而且增加了社会效益。

水体环境是微生物大量生长的地方,鱼类在正常状态下也有许多微生物寄生于体内,造成对真正病原分离、诊断和防治的障碍,而许多问题免疫学本身还无法解决。如分类上同种属的病原在免疫学上出现不同的血清型,给病原的研究带来很多不便,如果能应用生物工程技术,结合免疫学方法建立一套病原微生物快速检测系统,这样的生物工程产品必将为防治鱼类病害带来许多帮助,其经济前景非常广阔。

研 究 策 略

基因工程技术用于防治鱼类病害,在我国还在起步阶段*,由于水产领域分子生物学研究基础薄弱^[7],只有借鉴兄弟学科的已有技术和成果,结合水产业的实际状况进行研究才有可能尽快走出自己的道路。

草鱼出血病是一种危害性比较大的病害,多年来对病原作了深入的研究,引起疾病的主要病原之一是呼肠孤病毒 (*Reovirus*),核酸由双链 RNA 组成,在电泳中显示 11 条片段,对各条片段所编码的功能蛋白已有所了解^[8],由于它的核酸分子相对小,可以给研究工作提供很大的便利,目前已经具备克隆基因的条件,可以反转录 11 条核酸片段,克隆于质粒中开展筛选免疫原性基因的工作。已有许多成功的基因表达载体可以直接引用,无疑给鱼用基因工程疫苗的研究开通了捷径。值得一提的是轮状病毒 (*Rotavirus*) 重组疫苗的研制工作可以供草鱼出血病重组疫苗研制借鉴^[9]。轮状病毒是一种引起人和畜类腹泻的病原,分类上与呼肠孤病毒同科 (*Leoviridae*)^[11],核酸也由双链 RNA 组成,在电泳中呈现 11 条片段。自 1981 年以来,开展了免疫原性基因的克隆工作,1984 年 Estes MK. 等人报导了克隆亚抗原 Vp6 基因过程;1982 年 McCrae 和 Mc Corquodale 报导了全长 Vp7 基因 cDNA (主要抗原基因之一)的克隆,并在 1987 年开始了针对该病毒的基因工程疫苗的研究^[12]。他们将 Vp7C 编码中和抗原的 cDNA 片段插入 PEX 表达质粒中的

* 李新辉 1992. 分子生物学方法在鱼类疾病防治研究上的应用, 全国生物技术在水产中研究和应用研讨会论文 (湖北沙市)

β -半乳糖酶 (β -Gal) C 端, 构成一个新的重组质粒, 然后转入大肠杆菌, 筛选出一株可以高产量的合成 β -Gal-Vp7C 融合蛋白的菌株^[13]。实验表明, 用融合蛋白免疫动物产生的高度免疫血清与轮状病毒感染的细胞可产生特异的免疫荧光反应, 与中和抗原也可以形成特异的免疫沉淀, 这些抗血清也能够中和同血清型病毒的感染性, 在标准空斑减少中和实验中, 中和效价较对照组可高 60 倍以上, 以这些研究中, 我们感受到, 针对类似草鱼出血病病原研究表面抗原蛋白基因, 生产基因工程疫苗是为期不远的的事情。

根据目前的基础, 针对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*), 研究快速检测试剂盒也是可能的。嗜水气单胞菌能引起软体动物、鱼类、两栖动物、爬行类、鸟类及哺乳类等多种动物全身败血症或局部感染, 并常致动物死亡, 是引人瞩目的人畜共患病的病原, 现在已初步确定致病株所产生的外毒素是其重要的致病因子^[10], 研究表明, 不论是人源的还是鱼源的, 或是环境来源的嗜水气单胞菌所产生的毒素性质基本相同, 推测它是单个分子的多肽, 分子量约 52kd, 由 18 种氨基酸组成, 具有溶血性、细胞毒性以及肠毒素性, 主要毒素编码基因在染色体上, 对基因的 DNA 序列、结构已有所研究。由于其毒素基因比较保守, 适宜作为致病性菌株鉴定的指标。在这样的基础上, 克隆毒性基因在体外生产该蛋白, 结合免疫学技术有可能制备检测试剂盒。重要的是许多研究者指出致病菌株能产生非致病毒株不产生的外毒素, 这样研究出的检测试剂盒在生产上有实用价值。

当然, 在引用外来技术研制防治鱼类病害生物工程产品的同时, 也必须投入足够的力量来研究鱼源性病原。目前鱼类病害许多病症仅是根据临床表征来推测相应的病原, 致使许多病原无法确定确切的种属, 贻误了治疗时间, 引用分子生物学技术可以较好地解决这一问题, 并为以后的应用研究打下基础。

小 结

我国鱼类生物技术研究已有一定的基础, 目前已逐渐向产业化方向努力, 以鱼类病害作为水产生物工程产业化研究的突破口是可行的。微生物遗传物质结构较高等生物简单, 容易进行遗传操作, 在病原研究方面, 兄弟学科中有许多可以借鉴的材料。在我们目前基础研究比较薄弱而且还不可能抽出很大笔资金去从事理论研究的情况下, 引用外来技术达到提高自己的水平是最佳途径, 客观上同种属的生物在基因结构上具有许多同源性, 从分子遗传学上可以为这样的技术引用作理论保证。此外, 鱼类应用在临床操作上较医学领域便利, 目前不会受到人伦、道德方面的束缚, 这是我们在应用研究阶段的一大优势。可以预计, 经过几年的努力是能研制出我们自己的, 可供应用的生物工程产品, 并在经济效益方面为投资者带来利益, 同时在投资方面也将形成一个良性循环, 促进整个水产领域各个学科的生物工程产业化发展。

参 考 文 献

- [1] 朱作言等, 1986. 人生长激素基因在泥鳅受精卵显微注射转移后的生物学效应. 科学通报, 5: 387-389.
- [2] 朱作言等, 1989. 转基因鱼模型的构建. 中国科学, (B) 2: 147-155.
- [3] 吴清江, 1988. 转基因鱼的研究战略. 生物工程进展, 9 (6): 20-25.

- [4] 费云标等, 1992. 淡水瓦氏雅罗鱼基因文库的构建和抗冻蛋白基因同源序列的筛选. 生物工程学报, 8 (2): 192-196.
- [5] 王宝龙、倪语星, 1993. 副溶血弧菌热性溶血素基因家族的研究进展. 国外医学微生物学分册, 16 (4): 167-169.
- [6] 陈怀育, 1992. 嗜水气单胞菌外毒素研究进展. 国外医学微生物学分册, 6: 256-259.
- [7] 李新辉, 1993. 鱼类分子遗传学研究及应用. 全国首届青年水产学术研讨会 (上海) 论文集, 同济大学出版社.
- [8] 王伟等, 1990. 草鱼出血病病毒武汉南湖株的精细结构与基因组及多肽的研究. 病毒学报, 6 (1): 44-48.
- [9] 刘民, 1990. 轮状病毒基因重组的研究进展. 国外医学微生物学分册, 1: 1-2.
- [10] 陆承平, 1992. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 16 (3): 282-288.
- [11] Matthews REF 1982. 《病毒的分类与命名》(中译本). 科学出版社.
- [12] Mc Crae MA. *et al.* 1982. Molecular biology of rotaviruses, IV. Molecular cloning of the bovine rotavirus genome. J. Virol. 44: 1076-1079.
- [13] Mc Crae MA. *et al.* 1987. Expression of a major bovine rotavirus neutralisation antigen (VP7c) in *Escherichia coli*. Gene, 55: 9-18.