

文章编号:1000-0615(2007)02-0241-09

## 草鱼三元病原菌融合子的构建及生物学特性

何福林<sup>1,2</sup>, 肖克宇<sup>1</sup>, 陈光荣<sup>1</sup>, 钟 蕾<sup>1</sup>, 何燕林<sup>1</sup>, 向建国<sup>1</sup>, 黄兴国<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128;

2. 湖南科技学院, 湖南 永州 425100)

**摘要:**采用细胞融合技术首次将肠型点状产气单胞菌菌株和鱼害粘球菌菌株融合, 构建二元融合菌株 AM-1, 再将 AM-1 与荧光假单胞菌菌株融合, 构建三元融合菌株 AM-2。对 AM-1 和 AM-2 菌株的形态结构、生理生化特性、致病性、抗原性、抗体效价进行分析。结果表明, AM-1 活菌椭圆形, 无鞭毛, 死菌短杆状, AM-2 菌株短杆状, 有鞭毛, 它们的生理生化性状介于 3 原始亲本菌株之间; 用 AM-2 菌株对当年健康草鱼种进行人工感染攻毒, 被攻毒草鱼种具有烂鳃病、赤皮病及肠炎病的部分症状; AM-2 菌株抗原的受免草鱼种对荧光假单胞菌、鱼害粘球菌和肠型点状产气单胞菌菌株的免疫保护率分别达 64.90%、68.00%、67.00%, 抗体效价最高达 1:256、1:256、1:512。测定了 AM-1 和 AM-2 菌株及亲本 DNA 含量并进行了琼脂糖凝胶电泳分析, AM-1 和 AM-2 菌株 DNA 含量明显高于任一原始亲本。

**关键词:** 荧光假单胞菌; 鱼害粘球菌; 肠型点状产气单胞菌; 细胞融合

**中图分类号:** Q 813.2; S 917.1

**文献标识码:** A

## Construction and its biological characteristics of tri-pathogenic bacteria syncretic fungus strains of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

HE Fu-lin<sup>1,2</sup>, XIAO Ke-yu<sup>1</sup>, CHEN Guang-rong<sup>1</sup>, ZHONG Lei<sup>1</sup>

HE Yan-lin<sup>1</sup>, XIANG Jian-guo<sup>1</sup>, HUANG Xing-guo<sup>1</sup>

(1. College of Animal Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425100, China)

**Abstract:** In this experiment the bi-pathogenic bacteria syncretic fungus strains (AM-1) were firstly constructed by syndesis of *Aeromonas punctata* f. and *Myxococcus piscicola* of grass carp via cell amalgamation technique, then tri-pathogenic bacteria syncretic fungus strains (AM-2) were constructed by syndesis of AM-1 and *Pseudomonas fluorescens* according to same technique. After the configuration, physiological and biochemical characteristics, nosogenesis, antigen, effective value of antibody of AM-1 and AM-2 were analyzed, the results showed that the living AM-1 is elliptic, no-flagellum and the dead one is short-haulm, while the AM-2 is short-haulm with flagellum, and their physiological and biochemical characteristics are among three original parental fungus strains. The healthy grass carp seeds were infected by AM-2 and were examined to show partial symptoms of festered-bacterial gill-rot disease, red-skin disease and bacterial enteritis of grass carp. After grass carp is immunized by antigen of syncretic fungus strains, the

收稿日期: 2006-09-11

资助项目: 湖南省科技厅基础研究计划项目(05FJ3060)

作者简介: 何福林(1968-), 男, 湖南永州人, 副教授, 硕士, 主要从事水生生物学研究。E-mail: hefulin0012@163.com

通讯作者: 肖克宇, Tel: 0731-4617149, E-mail: keyuxiao429@163.com

protective ratio of immunity of grass carp against *Pseudomonas fluorescens*, *Myxococcus piscicola*, *Aeromonas punctata f. intestinalis* are 64.9%, 68.0% and 67% respectively, and the rate of effective values of antibody are 1:256, 1:256, 1:512 respectively. After the DNA contents of AM-1, AM-2 and their parental fungus strains were analyzed by using gelose gelatin electrophoresis, the results showed that the DNA contents of syncretic fungus strains are significantly higher than that of their parental fungus strains.

**Key words:** *Pseudomonas fluorescens*; *Myxococcus piscicola*; *Aeromonas punctata f. intestinalis*; cell fusion

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 出血病、烂鳃病、赤皮病和肠炎病被认为是对草鱼危害最大的疾病,其中出血病可应用疫苗进行有效控制,抗病种的选育也取得了一些进展<sup>[1-2]</sup>,其余三病由细菌引起,主要依赖抗菌类药物治疗,但该方法弊大于利,对水产动物和人类存在潜在威胁,因而细菌病的免疫也同样受到关注。烂鳃病菌苗<sup>[3]</sup>和多联佐剂疫苗<sup>[4]</sup>的防治效果已显示了优越性,但存在效果不稳定,给予手续麻烦和制造成本高等诸多问题,导致细菌病免疫防治仍处在较低水平,因此,探讨成本低廉、安全高效、制造和应用方便的多功能鱼用菌苗是一项急待研究的课题<sup>[5]</sup>。

本文采用细胞融合技术将草鱼烂鳃病、赤皮病和肠炎病的病原菌进行融合,选育遗传性稳定的融合子,并对其生物学特性进行了分析,为研制多功能的灭活菌苗或弱毒菌苗等提供原材料和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验亲本菌株

肠型点状产气单胞菌(58-20-9)、鱼害粘球菌(G4)和荧光假单胞菌(56-12-10)菌株均由中国科学院水生生物研究所提供。

### 1.2 融合子构建

参考文献[6-8]筛选菌株的抗药性遗传标记和制备原生质体及进行细胞融合及再生。即将亲本菌种按1%接种于20 mL新鲜液体完全培养基中,28℃振荡培养至对数生长期,分别取供试亲株培养液10 mL,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,弃上清液,用SMM洗涤两次,收集菌体用10 mL SMM制成菌悬液。取1 mL菌悬液,适当稀释约含10<sup>3</sup> mL<sup>-1</sup>细菌,取0.1 mL分别涂完全培养基平板,28℃下培养24 h,计数未经酶处理的总菌数。其余菌悬液各取1 mL,分组加入溶菌酶3~7 mg,混匀后立即加入预热的EDTA 0.5 mL,37℃水浴20~60 min,随时镜检观察原生质体是

否形成,以杆状菌基本上变圆球形为准;将上述菌液离心后,原生质体分组悬浮于5 mL SMMD溶液中;各取原生质体悬浮液0.5 mL,分组放于4.5 mL无菌水中静置10 min,使原生质体裂解,各取0.1 mL涂完全培养基平板,每种菌株涂两个平板,28℃下培养24 h,计数经酶处理后的剩余菌数。取供试亲株的原生质体悬浮液各0.1 mL,用SMM溶液适当稀释,涂布在高渗再生培养基平板上,每种菌株涂两个平板,28℃培养48 h,进行菌落计数,获得原生质体再生数。取供试亲株原生质体各1 mL混合,2 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,弃上清液,向沉淀液中加入含40% PEG-6000的SMMD 1.8 mL和0.2 mL的新生磷酸钙溶液,混合均匀,37℃水浴10~20 min,适当稀释,取稀释液0.1 mL,涂布在再生培养基平板,28℃培养2~3 d。

参考文献[7-9]检出融合子,即用影印法将长出的菌落移植在双抗培养基上,48 h后再次影印在双抗平板上,使融合株充分分离,在第二次双抗平板上长出的菌落,可初步认为是融合株。检出融合株后,在完全培养基上用影印法连续传代10次以上,每代在28℃恒温箱中培养2 d,最后长出的菌落经双抗选择培养基验证可视为稳定的融合菌株,用显微摄像拍摄菌体形态。

### 1.3 融合子形态结构及生理生化特性观察

取3亲本菌株和融合子的培养物分别涂片,革兰氏染色观察其菌体形态、染色性,用测微尺测定菌体大小;将亲株和融合菌株分别用灭菌牙签点种在完全培养基平皿上,置28℃恒温箱连续培养30 d,形成巨大菌落,再进行形态比较;用悬滴法在显微油镜下观察各菌的运动力;用细菌鉴定常规生化试验检测各菌株的主要生化特性<sup>[10-11]</sup>。

### 1.4 融合菌株的DNA检测

参考文献[12-14]提取亲本菌株和融合菌株的DNA并测定其含量,取Mark及各DNA样10 μL进行琼脂糖电泳,控制电泳电压为65 V,电流

35 A,电泳后,将琼脂糖凝胶板进行紫外光照相。

### 1.5 融合菌株的致病性检测

将原始亲本菌株与融合子菌株分别接种于液体培养基中,28 ℃恒温箱中培养 24 h,用麦氏比浊管计数其菌数,然后用无菌生理盐水稀释成菌数为  $3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ,分别取菌液腹腔注射当年健康草鱼种(每尾 0.3 mL)各 20 尾,同时设注射无菌液体培养基为对照组。分组饲养在水族箱中,水源为曝气去氯后的自来水,增氧泵充氧,保持水温  $(28 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ ,每天早晚喂浮萍,连续观察两周,剖检病死鱼,参考文献[15]的方法检测融合子菌株与亲本菌株的致病性及病症异同。

### 1.6 融合菌株的抗原性检测

**抗原制备**<sup>[15]</sup> 将亲本菌、融合子菌种分别接种到斜面完全培养基,28 ℃恒温培养 24 h,每支斜面用 0.3% 甲醛生理盐水 5 mL 洗下菌苔制成菌悬液,置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $70 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养箱中 24 h 杀菌,取菌液接种培养基平板,经 24 ~ 28 h 培养无菌生长,可认为无菌检验合格,将合格菌液用灭菌生理盐水稀释,麦氏比浊法计数,使菌数为  $9 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ,置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中备用。

**免疫保护率试验**<sup>[15]</sup> 选择体重  $(51 \pm 4) \text{ g}$  一龄健康草鱼种 280 尾,饲养在  $1.5 \text{ m} \times 0.5 \text{ m} \times 0.5 \text{ m}$  水族箱中。试验分 A、B、C、D、E、F 6 组,其中 A、B、C 每组用鱼 30 尾,分别注射 56-12-10、58-20-9 和 G4 抗原,D 组用鱼 70 尾,注射融合子 AM-2 抗原,E 组用鱼 30 尾,注射 3 亲本混合抗原(56-12-10、58-20-9 和 G4 经福尔马林灭活按 1:1:1 混合制成抗原),F 组(对照组)用鱼 90 尾,注射无菌生理盐水。各组用增氧泵增氧,恒温  $(28 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ ,每天投喂浮萍并换水 1/3。两周不死鱼则表明抗原安全,各组取 10 尾鱼用于抗体凝集效价试验,其余用于活菌攻毒试验,A、B、C 组分别用 56-12-10、58-20-9 和 G4 攻毒;D 组分 D1、D2、D3 3 小组,分别用 56-12-10、58-20-9 和 G4 攻毒,E 组用融合子攻毒,F 组分 4 小组,分别用 56-12-10、58-20-9、G4 和融合子攻毒。每尾鱼注射剂量均为 0.3 mL,菌浓度为  $3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 。观察鱼活动和死亡情况,按公式计算免疫保护率:免疫保护率 =  $(1 - \text{受免鱼死亡率} / \text{对照鱼死亡率}) \times 100\%$ 。

**采血及凝集抗体效价的测定**<sup>[15]</sup> 将用于检测凝集抗体效价的草鱼种每隔 7 d 采血一次,

每次随机捞取 5 尾,尾动脉采血置于灭菌指管内,室温下静置 30 min, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,吸取血清供测定凝集抗体效价。在聚乙烯 96 孔“V”形孔反应板上测定草鱼血清的抗体效价,反应板在  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱中反应 2 h,再置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中过夜,翌日判定结果。

### 1.7 统计分析

采用  $\chi^2$  检验对免疫保护率进行差异显著性检验,采用 *F* 检验对 DNA 含量进行差异显著性检验,采用新复极差法进行多重比较;所有检验均用 SAS(8.10 版)软件进行统计。

## 2 结果

### 2.1 亲本菌的抗药性遗传标记

定性药敏试验显示,22 种供试药物中,58-20-9 菌株对庆大霉素高度敏感,对红霉素不敏感,G4 菌株对这两种药的敏感性与之相反,庆大霉素和红霉素可作为这两菌株融合时筛选抗药性遗传标记的交叉耐药药物,定量试验确定选择性培养基中庆大霉素应用剂量为  $3\ 000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,红霉素为  $50 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

用 58-20-9 菌株与 G4 菌株的二元融合子 AM-1 菌株和 56-12-10 菌株对 17 种药物的耐药性定性试验结果显示,AM-1 菌株对环丙沙星高度敏感,对链霉素敏感性低,56-12-10 菌株与之相反,环丙沙星和链霉素可作为这两菌株融合时筛选三元融合子的交叉耐药药物,定量试验确定选择性培养基中环丙沙星应用剂量为  $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,链霉素为  $300 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.2 原生质体制备、融合及融合子检出

经细菌生长曲线测定,58-20-9 菌株对数期为 5 ~ 6 h,G4 菌株为 6 ~ 7 h,56-12-10 菌株为 4.5 ~ 6.5 h,AM-1 菌株为 6.5 ~ 7.5 h。取对数期菌株制备原生质体,经 EDTA 和溶菌酶脱壁后的 58-20-9 菌株和 G4 菌株形状呈球形,原生质体形成率分别为 54.7% 和 50.8%。当两原生质体混合,在 40% PEG-6000 和新生磷酸钙溶液促融下,显微镜下可见凝聚现象。将融合原生质体涂布在高渗再生培养基上,细胞壁恢复,48 h 后形成菌落,将其连续两次影印在含庆大霉素和红霉素的双抗选择培养基平板上,28 ℃恒温培养 48 h 后长出较小菌落,为 58-20-9 菌株和 G4 菌株融合体再生菌,初筛的原生质体融合率为

4%,取此融合子 500 个菌落连续在双抗选择培养基平板上传代 12 代,菌落数逐代减少,最后只有 1 个菌落可稳定传代,此菌为供三元融合用的二元融合菌株,代号为 AM-1。

将 AM-1 菌株和 56-12-10 菌株按上述方法进行三元细胞融合试验,AM-1 菌株的原生质体形成率为 79.2%、再生率为 8.2%,56-12-10 菌株的原生质体形成率为 81.6%、再生率 19.8%,在含环丙沙星和链霉素双抗选择培养基上初筛的原生质体融合率为 6‰,经过连续传代 12 次,得到 1% 的稳定三元融合子,所得菌株为三元细胞融合菌株,代号为 AM-2。AM-1 和 AM-2 菌株形态见图 1、图 2。

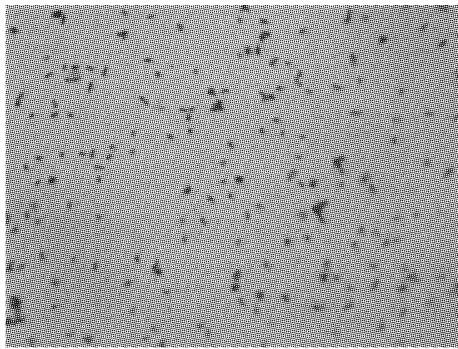


图 1 AM-1 菌株(10×100)  
Fig. 1 AM-1 strain

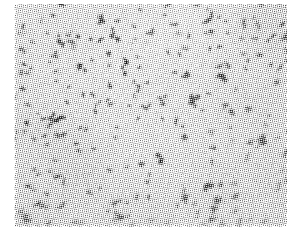


图 2 AM-2 菌株(10×100)  
Fig. 2 AM-2 strain

### 2.3 融合子形态结构及生理生化特性

**融合子形态特征** 融合株 AM-2、AM-1 染色性与 3 原始亲本基本相同,AM-2 运动性与 AM-1 相比发生改变,菌体形态相对更近于 AM-1 亲本株,菌落形态以及菌体大小均介于 3 原始亲本株之间(表 1)。

**融合子生理生化特性** 融合子和亲本部分生理生化性状鉴定结果见表 2。结果表明,融合子 AM-2 与 56-12-10 菌株相比,在 MAN、GEL 上明显不同(阴阳性相反),与 58-20-9 菌株相比,在 V.P、M.R、MAL 上明显不同,与 G4 相比,在 V.P、M.R、GLU、SUC 上明显不同,其余各项生化指标几个菌株都相同。说明三元融合子菌株在 3 亲本菌株的基础上某些生化特性已发生改变,倾向于各个亲本阳性反应。

表 1 融合菌株与亲本菌株的形态结构

Tab. 1 The morphology between the syncretic and parents fungus strains

菌株 strain	革兰氏染色 gram stain	运动性 movement	菌体形态 mycelial morphology	菌落形态 colony morphology	平均长轴(μm) average length of longer axis	平均短轴(μm) average length of shorter axis	平均体积(μm <sup>3</sup> ) average volume
58-20-9	阴性 (G-)	穿梭 运动	活菌椭圆形近圆点状,极端单鞭毛,死菌短杆状,多数 2 个相连	圆形,中央隆起,灰白色,半透明有光泽,边缘整齐	1.15	0.48	0.14
G4	阴性 (G-)	滑行	活菌长杆状,无鞭毛,死菌短杆状	扩散型,由淡黄色变为灰色,边缘不整齐,中央较厚半透明,有光泽	12.50	0.52	17.69
56-12-10	阴性 (G-)	运动	活菌杆状,有鞭毛	微隆起,表面光滑、湿润,边缘整齐,灰白色	2.55	0.74	0.73
AM-1	阴性 (G-)	不运动	活菌椭圆形,无鞭毛,死菌短杆状	近圆形,中央隆起,乳白色有光泽,边缘不整齐,半透明	5.65	0.78	1.79
AM-2	阴性 (G-)	运动	活菌杆状,有鞭毛	圆形,表面光滑、湿润,半透明,边缘整齐	4.52	0.75	1.33

表 2 融合菌株与亲本菌株的生理生化特性

Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of the syncretic and parents fungus strains

序号 serial no.	试验名称 test name	试验结果 test result				
		56-12-10	58-20-9	G4	AM-1	AM-2
1	乙酰四基甲醇试验 V·P test	-	+	+	+	-
2	甲基红试验 M·R test	-	+	+	+	-
3	过氧化氢酶试验 O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> test	+	+	+	+	+
4	氧化酶试验 OXD test	+	+	+	+	+
5	葡萄糖发酵试验 GLU ferment test	+	+	+	+	+
6	乳糖发酵试验 LAC ferment test	+	+	-	+	+
7	麦芽糖发酵试验 MAL ferment test	-	-	-	-	-
8	蔗糖发酵试验 SUC ferment test	-	+	-	-	-
9	β-半乳糖苷酶试验 BGU test	+	+	-	-	+
10	甘露醇发酵试验 MAN ferment test	-	+	+	+	+
11	精氨酸双水解酶试验 ADH test	+	+	+	+	+
12	明胶液化试验 GEL test	+	-	+	+	-

注:“+”阳性;“-”阴性

Notes:“+”positive;“-”negative

## 2.4 融合菌株的 DNA 含量

融合菌株与亲本菌株 DNA 含量见表 3,由表可知,融合菌株 AM-2 的 DNA 含量均高于 3 原始亲本和 AM-1 菌株 DNA 含量,经检验,差异均

达到了极显著水平( $P < 0.01$ );AM-1 菌株 DNA 含量也分别高于 3 亲本菌株 DNA 含量,差异达到了极显著水平( $P < 0.01$ )。

表 3 融合菌株与亲本菌株的 DNA 含量

Tab. 3 The DNA contents of the syncretic and parents fungus strains

菌株 strain	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$				
	58-20-9 菌株 58-20-9 strain	56-12-10 菌株 56-12-10 strain	G4 菌株 G4 strain	AM-1 菌株 AM-1 strain	AM-2 菌株 AM-2 strain
第 1 次测量值 the first measure data	934	832	780	1404	1809
OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	1.71	1.72	1.87	1.76	1.80
第 2 次测量值 the second measure data	938	834	786	1406	1810
OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	1.72	1.70	1.90	1.75	1.82
第 3 次测量值 the third measure data	940	839	790	1409	1816
OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	1.74	1.67	1.91	1.79	1.86
测量平均值 average measure data	937.33 ± 3.06	835.00 ± 3.61	785.33 ± 5.03	1406.33 ± 2.52	1811.67 ± 3.78

OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 主要介于 1.7 ~ 1.9,说明纯度可靠,个别低于 1.7,说明样品污染了一定的蛋白。亲本菌株与融合子 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果见图 3,二元融合子 AM-1 与三元融合子 AM-2 离点样孔的距离明显小于其任一亲本离点样孔的距离,且 AM-2 稍微近于 AM-1,说明融合子的 DNA 分子量比其亲本的 DNA 分子量大,初步证实了上述 DNA 含量测定结果。

## 2.5 融合菌株的致病性

注射原始亲本和 AM-2 活菌的当年健康草鱼种各 20 尾,两周内陆续死亡 17 ~ 19 尾,其中 AM-2 组死亡 19 尾,死亡率 95%,注射无菌液体

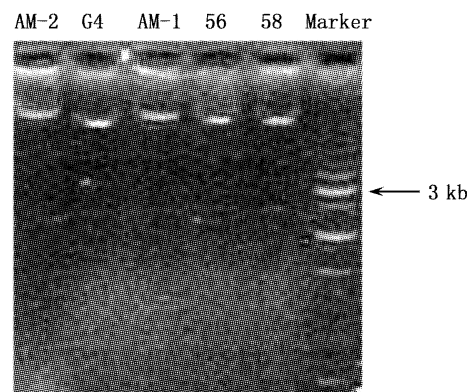


图 3 菌株 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agrose gel electrophoresis of DNA

培养基对照组成活率 100% (表 4)。AM-2 菌株与 3 亲本菌株均能够引起健康草鱼发病, AM-2

菌株引起病鱼症状兼有草鱼肠炎病、烂鳃病及赤皮病部分症状。

表 4 融合菌株与亲本株感染草鱼的病症表现

Tab.4 Different symptoms between grass carp infected by the syncretic and parents fungus strains

检验项目 test item	56-12-10 菌株 strain	58-20-9 菌株 strain	G4 菌株 strain	AM-2 菌株 strain
体表症状 surface symptom	体表出血、发炎,鳞片脱落,鳍充血,鳍端腐烂成扫帚状	病鱼离群独游,体色发黑,肛门红肿,严重时腹部膨大,提起头部有黄色粘液从肛门流出	病鱼体色发黑,鳃盖内表面充血发炎,中间部分糜烂,鳃粘液多,鳃丝肿胀变红	头部、眼眶下充血,鳍条、鳃部糜烂,腹部膨大,肛门红肿,有红色斑点
组织涂片 tissue smear	病变组织涂片可见大量杆状菌,肾、脾脏等组织有较多菌体	肠组织涂片可见大量两个相连短杆状菌,肝、肾脏等组织有少量菌体	鳃粘液压片可见大量细长滑杆状菌,有些菌体聚集成柱状	体表、鳃、肠、肾、肝组织涂片,均有较多菌体

## 2.6 融合菌株的免疫保护率

用于攻毒对照的 4 组草鱼最后全部死亡, A 组对 56-12-10 攻毒的免疫保护率为 61.30%; B 组对 58-20-9 攻毒的免疫保护率为 60.00%; C 组对 G4 攻毒的免疫保护率为 65.50%。D 组对这 3 种病原菌分别攻毒的免疫保护率分别为 64.90%、67.00% 和 68.00%。E 组对 AM-2 活菌攻毒的免疫保护率为 62.50% (图 4)。从数值看, D 组 (AM-2 抗原受免草鱼) 对 3 亲本活菌攻毒的免疫保护率虽均高于相对应 3 亲本抗原受免草鱼的免疫保护率, 但经  $\chi^2$  检验, A 组与 D1 组、B 组与 D2 组、C 组与 D3 组、D 组与 E 组之间的免疫保护率差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 说明 AM-2 抗原受免草鱼与 3 亲本抗原受免草鱼对 3 种病原均具有同等的免疫保护率。

## 2.7 融合菌株的抗原性

各种抗原接种草鱼种后, 每周采血一次, 连续 5 周, 血清分别与 56-12-10、58-20-9、G4 抗原和融合子抗原进行凝集试验, 同种菌凝集原与凝集素之间凝集显著; 作交叉凝集反应时, 融合子与亲本菌株之间有凝集现象, 而不同菌株无明显凝集 (表 5)。

取 AM-2 抗原与 3 亲本混合抗原免疫草鱼的血清与各亲本抗原进行凝集反应, 测得草鱼凝集抗体效价, 根据抗体效价的众数确定抗体效价及其变化值 (表 6)。

从表 6 可知, 草鱼经 2 种抗原刺激后, 对 3 亲本抗原的凝集抗体效价均在接种后逐渐上升, 于免疫后第 4 周达到峰值。凝集抗体效价最高在 AM-2 抗原试验组, 分别平均为 1:256、1:256 和

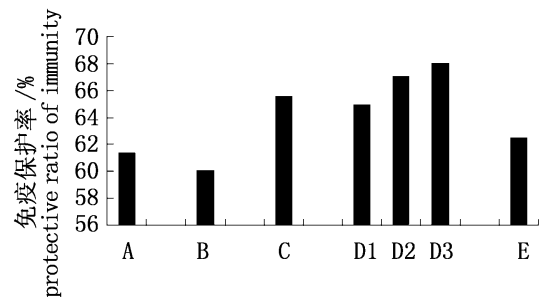


图 4 受免草鱼免疫保护率

Fig. 4 The protective ratio of immunity of immunized grass carp

A. 56-12-10 抗原免疫草鱼; B. 58-20-9 抗原免疫草鱼; C. G4 抗原免疫草鱼; D1、D2、D3. 融合子抗原免疫草鱼; E. 3 亲本混合抗原免疫草鱼

A. the grass carp immunized by 56-12-10 strain antigen; B. the grass carp immunized by 58-20-9 strain antigen; C. the grass carp immunized by G4 strain antigen; D1、D2、D3. the grass carp immunized by AM-2 strain antigen; E. the grass carp immunized by three original parental fungus strain antigen

1:512, 接种亲本混合抗原草鱼血清凝集抗体效价分别为 1:128、1:128 和 1:256, 对照组草鱼凝集抗体效价始终保持在 1:4.0, 说明这两种抗原均能刺激草鱼快速产生凝集抗体。

## 3 讨论

### 3.1 原生质体融合构建细胞融合株的可能性

细胞融合 (cell fusion) 是指两个或多个细胞融合成一个双核或多核细胞, 使一个细胞遗传物质包括细胞核 DNA 和核外基因都进入另一个细胞<sup>[16]</sup>。微生物细胞融合要去掉细胞壁才能进行,

表 5 融合菌株与亲本菌株的交叉凝集

Tab.5 The intercrossed agglutination between the syncretic and parents fungus strains

	56-12-10 菌株 strain					58-20-9 菌株 strain					G4 菌株 strain				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
AM-2 菌株 strain	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
56-12-10 菌株 strain	+	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58-20-9 菌株 strain	-	-	-	-	-	+	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-
G4 菌株 strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	卅	卅	卅

注: + 表示凝集, - 表示未凝集, 卅 表示凝集显著

Notes: +, agglutination; -, non-agglutination; 卅, notable agglutination

表 6 免疫组与对照组草鱼凝集抗体效价

Tab.6 Changes of agglutinating antibody titers in the serum of immunized grass carp and control grass carp

测试时间 test time( week)	组别 team	反应抗原及凝集抗体效价 reactivity antigen and agglutinating antibody titers		
		56-12-10 菌株灭活疫苗 inactivate bacterin of 56-12-10 strain	G4 菌株灭活疫苗 inactivate bacterin of G4 strain	58-10-9 菌株灭活疫苗 inactivate bacterin of 58-10-9 strain
I	1	1:8.0[1:(4~8)]	1:8.0[1:(4~8)]	1:8.0[1:(4~8)]
	2	1:16[1:(8~16)]	1:16[1:(8~16)]	1:32[1:(8~32)]
II	对照 contrast	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)
	1	1:16[1:(8~16)]	1:16[1:(8~16)]	1:16[1:(8~16)]
III	2	1:32[1:(16~32)]	1:32[1:(8~32)]	1:32[1:(8~32)]
	对照 contrast	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)
IV	1	1:32[1:(16~32)]	1:32[1:(8~32)]	1:64[1:(32~64)]
	2	1:64[1:(32~64)]	1:64[1:(16~64)]	1:128[1:(32~128)]
V	对照 contrast	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)
	1	1:128[1:(64~128)]	1:64[1:(32~64)]	1:256[1:(128~256)]
V	2	1:256[1:(128~256)]	1:256[1:(64~256)]	1:512[1:(256~512)]
	对照 contrast	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)
V	1	1:128[1:(64~128)]	1:128[1:(32~128)]	1:256[1:(128~256)]
	2	1:256[1:(128~256)]	1:256[1:(64~256)]	1:256[1:(128~256)]
V	对照 contrast	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)
	1	1:128[1:(64~128)]	1:128[1:(32~128)]	1:256[1:(128~256)]
V	2	1:256[1:(128~256)]	1:256[1:(64~256)]	1:256[1:(128~256)]
	对照 contrast	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)	1:4.0(1:4.0)

注:“1 组”表示浓度比 1:1:1 的 56-12-10、58-20-9、G4 混合抗原注射的草鱼血清,“2 组”表示 AM-2 抗原注射的草鱼血清,“对照组”表示未免疫的草鱼血清

Notes:“team1”denotes the serum of grass carp injected by mixed antigen of 56-12-10,58-20-9 and G4 which thickness rate is 1:1:1;“team2” denotes the serum of grass carp injected by AM-2 antigen;“contrast team” denotes the serum of non-immunized grass carp

故又称之为原生质体融合 (protoplast fusion),它是继转化、转导和接合之后一种更有效转移遗传物质的手段。微生物原生质体融合技术经过近 30 年发展获得了系列成果,充分证明是一种超越了种属和性隔离的育种新技术,其原生质体制备、融合及融合子筛选和检出技术已十分完善、可靠,应用该技术能使微生物遗传基因高频率重组,而且可以集双亲优良遗传性状为一体,广泛用于创造有应用前景生物<sup>[17-18]</sup>。国外 20 世纪 70 年代就成功进行了微生物种内、异种、异属间细胞融合<sup>[19-21]</sup>。国内利用原生质体融合技术先后选育出谷氨酸高产融合菌株、水解淀粉糊精生产低糖啤酒的融合菌株等众多优良性状的菌株,并且在医学和兽医学领域实现了较多的两种病原菌融合

子的构建。然而,国内外尚无生物医药类三元融合菌株构建和选育报道,也没有鱼类病原菌原生质体融合及对融合子生物学特性进行全面研究的报道,因此,开展本试验将为建立三元融合子构建的理论和提供一定科学资料。

### 3.2 融合子 AM-2 菌株与亲本的关系

本试验首先构建二元融合子 AM-1 菌株,再用同样方法构建三元融合子 AM-2 菌株。从菌株形态结构、生理生化特性、致病性、抗原性上检出了 AM-2 菌株兼有 3 原始亲本菌株部分或全部性状,这在一定程度上表明 AM-2 菌株是 3 种病原菌亲本的融合子。孙剑秋等<sup>[22]</sup>认为,原生质体融合后的关键问题是怎样选择出具有优良性状的融合子,除在再生培养基上获再生出的标记得

到互补的菌落,可以初步判定它是融合子,还要对融合子从形态学、生理生化特性、生物量、遗传学(基因型、DNA含量、GC比、DNA限制性内切酶酶切片段的比较、核苷酸序列分析、分子杂交、RAPD、16S rDNA技术)等方面选做某些实验来鉴定融合子。由于本试验目的在于构建具有抗原性和免疫保护作用的疫苗菌株,主要检测项目大都在这方面展开,并且检测到一些所需性状,在遗传学上对其DNA含量作了测定,AM-2菌株 $OD_{260}/OD_{280}$ 介于1.80~1.86,说明纯度可靠,AM-2菌株DNA含量为 $1\ 811.67 \pm 3.78$ ,用琼脂糖电泳试验证实了其DNA分子量大于3原始亲本。这些是验证该融合子是否有应用价值的需检项目,但尚不能足以从遗传学上完全阐明融合子的遗传规律,在今后运用融合子开展规模化生产疫苗之前,仍有待于应用16S rDNA等技术鉴定融合子携带的隐性或显性表达的遗传信息及其可能影响疫苗效果的性状予以监测。

### 3.3 融合子AM-2菌株的致病性及其抗原免疫鱼的抗体和免疫保护率

马大龙<sup>[23]</sup>认为,病原体与宿主的相互作用贯穿于致病与发病过程的始终,直接影响感染的后果及疾病的转归,而免疫反应的诱导是复杂和可能有多向发展的现象,这是研制疫苗中应予注意的。用有致病作用的痢疾全菌做成灭活菌苗免疫机体,可产生高效价的血清抗体,但没有免疫保护效果,说明病原体的致病性、血清抗体和免疫保护作用之间关系的复杂性。本实验中,注射融合菌株活菌的当年健康草鱼种的死亡率达95%,死鱼呈现草鱼肠炎、赤皮和烂鳃病部分症状,说明该菌株具有3种亲本菌的致病性,凝集抗体效价结果表明,融合子具有较强免疫原性和反应原性,而且其受免草鱼显示了抗三种病原的较高水平的免疫保护力,这些特性为该融合子制备草鱼细菌“三病”灭活疫苗带来了效果检测上的方便和实用价值,若应用此融合菌株制备疫苗,既可减少联合疫苗研制中配比各抗原成分的工作繁琐性和效果不确定性,又可用生产单一疫苗工艺制备多功能联合疫苗,降低生产成本和缩短生产周期,应用前景广阔。然而,该融合菌株的致病因子、保护性抗原成分、抗体类型、产生机制及其相关性尚待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 黄琪琰. 水产动物疾病学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1993:58-196.
- [2] 吴维新,李传武. 抗病草鱼(83-2系鱼)选育[J]. 中国水产科学,1997,4(2):74-78.
- [3] 陈昌福,纪国良. 草鱼烂鳃病的免疫研究[J]. 淡水渔业,1989,(2):8-10.
- [4] 肖克宇,金燮理. 草鱼多联佐剂疫苗的研制I. 疫苗的制备及免疫原性研究[J]. 湖南农学院学报,1992,18(2):330-335.
- [5] 杨先乐. 鱼用疫苗的现状及发展趋势[J]. 水产学报,1996,20(2):159-164.
- [6] 张卓然,倪语里. 临床微生物学和微生物检验[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:492-515.
- [7] 李明秀,马玉娥. 微生物的原生质体融合与应用[J]. 微生物学通报,1995,22(6):365-370.
- [8] 林雅兰,黄秀梨. 现代微生物学与实验技术[M]. 北京:科学出版社,2000:102-105.
- [9] 林红雨,陈策实,尹光琳. 欧文氏菌和棒杆菌的属间融合研究[J]. 微生物学通报,1999,26(1):3-6.
- [10] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2000:319-412.
- [11] 肖克宇,陈昌福. 水产微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2004:258-295.
- [12] 李永明,赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]. 科学出版社,1999:21-23.
- [13] Lutz CT. A laboratory manual of molecular biology, department of pathology[M]. University of Iowa, Iowa,1989:52-242.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.
- [15] 韩文瑜,何昭阳,刘玉斌. 病原细菌检验技术[M]. 吉林:吉林科技出版社,1992:84.
- [16] Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell, 3rd ed[M]. New York & London: Garland Publishing,1994:4-5.
- [17] Kumari J, Anjan I, Panda T. Intergeneric hybridization of trichoderma reesei QM9414 and saccharomyces cerevisiae NCIM 3288 by protoplast fusion[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1994,16(10):870-882.
- [18] Yu J X, Yi P, Tang M J, et al. Highly toxic and broad-spectrum insecticidal Bacillus thuringiensis engineered by using the transposon Tn917 and pro-



- toplast fusion [J]. *Current Microbiology*, 2001, 43 (2): 112 - 119.
- [19] Peberdy J F. Fungal protoplasts: isolation, reversion, and fusion [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1979, 33: 21 - 39.
- [20] Ferenczy L, Szegtdi M, Andkeveli F. Interspecific protoplast fusion and complementation in *Aspergilli* [J]. *Experientia*, 1977, 33(2): 184 - 186.
- [21] Fournier P, Provost A, Bourguignon C. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis* [J]. *Arch Microbiol*, 1977, 115(2): 143 - 149.
- [22] 孙剑秋, 周东坡. 微生物原生质体技术 [J]. *生物学通报*, 2002, 37(7): 9 - 11.
- [23] 马大龙. 生物技术药物 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 176 - 187.

· 书讯 ·

《中国渔业经济与管理研究论丛》

改革开放以来,我国渔业经济快速发展,水产品总量连续十多年位居世界第一位,渔业在大农业中的地位也逐步提高。但近年来,随着传统经济鱼类普遍衰退以及新国际海洋制度的形成,给我国渔业的发展带来了一定的影响,而捕捞努力量的相对过剩及作业渔场面积的缩小,更导致了渔业经济效益的下降。除此之外,在渔业经济可持续发展的过程中还出现了诸如渔业税费改革、海洋捕捞渔民的转产转业、提高渔业科技贡献率、渔业生产安全、水产品质量安全、水产品贸易摩擦等新问题。针对这些问题,上海水产大学的高健、韩兴勇、杨正勇和唐建业等四位博士,分别以《中国海洋渔业经济可持续发展的经济组织制度》、《上海现代渔村社会发展史研究》、《论个体可转让配额制度的交易成本》和《捕捞限额制度研究》为题,围绕渔业权争端、渔村社会发展、渔业制度建设、渔业资源管理等问题展开了深入研究,提出了一些颇具理论意义和实践价值的结论。该套丛书是我国较早针对渔业问题进行系统研究的书籍,它的出版可以为我国渔业政府部门的管理决策提供理论咨询,进一步推动渔业研究的发展。