

对虾抗菌肽转基因水稻抑制饲料腐败和 防治罗非鱼细菌病害的初步研究

官魁^{1,3}, 王雷¹, 付亚萍², 王宝杰¹, 刘文真², 蒋克勇¹, 刘梅^{1*}

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国水稻研究所, 浙江 杭州 310006;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 探讨了以植物生物反应器开发利用抗菌肽类物质防治水产动物病害的效果和机理。以携带中国明对虾抗菌肽—对虾素3-2的转基因水稻米糠制作罗非鱼饲料, 研究其对饲料腐败和吉富罗非鱼嗜水气单胞菌肠炎的抑制效果。通过测定米糠和饲料中的霉菌总数、细菌总数, 发现水稻中表达的对虾素3-2能有效抑制饲料中的霉菌与细菌的繁殖, 对于保持饲料品质具有显著的效果。选取规格一致、体质健壮的吉富罗非鱼, 随机分成5组, 每组3个重复, 分别投喂含20%非转基因米糠的饲料与含不同质量比(10%、20%、30%)的转基因米糠的饲料。通过嗜水气单胞菌攻毒保护实验, 结果发现, 转基因米糠对罗非鱼嗜水气单胞菌肠炎具有显著的保护效果。对吉富罗非鱼的肠道主要微生物数量、中肠石蜡切片的进一步分析发现, 摄食转基因米糠饲料组的罗非鱼肠道内大肠杆菌比例降低, 乳酸菌比例提高, 肠道微绒毛的结构完整性显著改善。由此推断抗菌肽转基因水稻的防病效果可能与肠道微生物的改变和对肠道结构的保护作用有关。但是石蜡切片发现过量添加转基因米糠(30%)也会导致吉富罗非鱼肠道上皮细胞损伤。

关键词: 对虾素3-2; 转基因水稻; 饲料; 吉富罗非鱼; 嗜水气单胞菌; 肠道菌群

中图分类号: S 941; Q 785

文献标志码: A

抗菌肽存在于所有生物体内, 是生物机体抵御外界微生物侵害、清除体内突变细胞的一类小分子多肽。抗菌肽会在感染或发炎部位大量产生, 并能与宿主细胞相互作用来调节机体炎症进程及免疫反应^[1-2]。抗菌肽的作用机理除直接杀灭病原微生物之外, 还可能作为免疫促进剂来调节机体免疫反应, 辅助其他免疫分子发挥作用^[3]。已有研究发现部分抗菌肽具有抗菌、无耐药性、热稳定、水溶性好、无残留等优点, 符合绿色环保及便于与现代饲料生产流程相结合的实用特点。当前对抗菌肽的研究期望获得两方面突破, 一方面在分子水平上弄清抗菌肽的合成过程及其调控机制; 另一方面, 则是通过探讨抗菌肽的药用

开发价值, 使之成为新型抗菌药物或饲料添加剂, 从而为解决细菌对抗生素日益增强的耐药性这一棘手问题提供新途径^[4-6]。

对虾素类抗菌肽是从中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血淋巴中得到的一种抗菌肽, 其杀菌活力很高, 致死浓度在微摩尔每升; 作用迅速, 往往在几秒或几分钟内可将99%以上的菌杀灭; 活性稳定, 比较耐热, 100℃下处理30 min不丧失其抗菌活性; 在高盐环境下, 同样具有抗菌活性。在分子结构上, 一个对虾素分子具有其它生物两类抗菌肽分子的特点, 即富含脯氨酸的氨基端区域和含有3个二硫键的环型羧基端区域。这对应于两类不同的抗菌肽: (1) 线

收稿日期: 2011-08-11 修回日期: 2011-11-10

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100311)

通讯作者: 刘梅, E-mail: liumei@ms.qdio.ac.cn

型的富含脯氨酸的抗菌肽,一般具有抗革兰氏阴性菌的活性;(2)具有3个分子内二硫键、环形的富含半胱氨酸的抗菌肽,多数具有抗革兰氏阳性菌的活性。因此,对虾素具有抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的广谱抗菌活性。已有研究结果显示体外重组表达的对虾素对多种细菌以及霉菌均显示较强的拮抗性^[7-9]。

从中国明对虾血细胞中克隆得到对虾素 3-2 基因,并通过农杆菌介导法将该基因转入水稻,通过后代筛选获得遗传稳定的纯合转基因株系,转基因水稻对植物病害抗性明显增强^[10]。本研究采用转基因水稻的米糠制作罗非鱼饲料,探讨了转基因水稻米糠对饲料中微生物增殖及对吉富罗非鱼抗病力的影响效果,为开发新型抑菌抗病水产饲料提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验动物 吉富罗非鱼 (genetic improvement of farmed tilapia, GIFT), 平均体长 (8.16 ± 0.19) cm, 平均初始体质量 (10 ± 0.53) g, 购于山东胶州罗非鱼国家级良种场。

对虾素转基因米糠 将来源于中国明对虾的对虾素 3-2 基因 (penaeidin 3-2, GenBank 登录号 DQ308408) 通过农杆菌介导法转入水稻品种爱之旭 (*Aichi ashahi*) 中, 通过对转基因植株后代的选育获得 T2 代稳定遗传的纯合株系, 收集种子, 脱壳粉碎获得米糠。该工作由合作单位中国水稻研究所协助完成。

水产病原菌 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*), 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

培养基与常用试剂 麦康凯琼脂、MRS 培养基、平板计数琼脂、高盐察氏琼脂, 购自北京陆桥技术有限责任公司。

Carnoy 氏固定液: 600 mL 乙醇, 300 mL 氯仿, 100 mL 冰醋酸, 混匀。

苏木精-伊红染色试剂盒 购自南京建成生物研究所。

1.2 实验方法

对虾素转基因饲料制作 根据 SC/T 1025-2004 罗非鱼配合饲料水产行业标准设计饲料配方 (表 1)。以优质鱼粉、豆粕为蛋白源, 优质鱼

油为脂肪源, 饲料原料均过 60 目筛, 配制成 4 组等氮等能的实验饲料, 将原料充分混合后用绞肉机加工成颗粒饲料, 低温晾干并保存备用。

表 1 饲料配方及主要营养成分 (风干物质)
Tab. 1 Formulation and nutritional composition of experimental diets (air-dry basis)

原料/% ingredients	组别 group			
	1	2	3	CK
鱼粉 fish meal	10	10	10	10
豆粕 soybean meal	23	23	23	23
花生粕 peanut meal	10	10	10	10
菜粕 rapeseed meal	14	14	14	14
鱼油 fish oil	3	3	3	3
次粉 wheat-middlings	25.5	15.5	5.5	15.5
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.2	1.2	1.2	1.2
食盐 salt	0.12	0.12	0.12	0.12
氯化胆碱 choline chloride	0.18	0.18	0.18	0.18
预混料 feed premix	3	3	3	3
米糠 rice bran	10	20	30	20
总量 total quantity	100	100	100	100

注: 预混料为每千克饲料提供维生素和微量元素, VE 50 mg; VK 5 mg; VA 1 2 000 IU; VD₃ 3 000 IU; VB₁ 15 mg; VB₂ 30 mg; VB₆ 15 mg; VB₁₂ 0.5 mg; 烟酸 155 mg; 叶酸 5 mg; 肌醇 1 000 mg; 生物素 2.5 mg; 泛酸钙 50 mg; 铁 25 mg; 铜 3 mg; 锰 12 mg; 碘 0.6 mg; 镁 0.7 g。1、2、3 组中添加 Penaeidin3-2 转基因米糠, CK 组中添加非转基因米糠。

Notes: The premix provides vitamin and mineral for a kilogram of diet, VE 50 mg; VK 5 mg; VA 12 000 IU; VD₃ 3 000 IU; VB₁ 15 mg; VB₂ 30 mg; VB₆ 15 mg; VB₁₂ 0.5 mg; nicotinic acid 155 mg; folic acid 5 mg; inositol 1 000 mg; biotin 2.5 mg; pantothenic acid 50 mg; Fe 25 mg; Cu 3 mg; Mn 12 mg; I 0.6 mg; Mg 0.7 g. The trial group 1, 2, 3 are respectively added 10%, 20%, 30% transgenic rice bran into the basal diet, the group CK is added 20% non-transgenic rice bran into the basal diet.

实验分组设计 选用 270 尾规格一致、体质健壮的吉富罗非鱼, 随机分成 5 组, 每组各 54 尾鱼, 分为 3 个重复, 每重复 18 尾鱼。分组情况: CK1 与 CK2 组为对照组, 投喂添加 20% 非转基因米糠的饲料; 1# 实验组投喂添加 10% 转基因米糠饲料, 2# 实验组投喂添加 20% 转基因米糠饲料, 3# 实验组投喂添加 30% 转基因米糠饲料。

实验鱼管理 吉富罗非鱼驯化暂养 15 d, 饲养于自动充气、控温的养殖桶 (高 1.2 m, 直径 1.2 m) 中。养殖水系地下井水, 经曝晒, 加热维持水温在 (26 ± 1) °C。日投饵 2 次 (9:00, 16:00), 投饵率为罗非鱼体质量的 2.5% ~ 3.0%, 根据摄食情况灵活调整。投饵 1 h 后吸走残饵与粪便, 每天换水量为养殖水体 1/3。实验期间的水

质指标:pH(7.91 ± 0.03),溶解氧(5.81 ± 0.07) mg/L,氨氮(0.10 ± 0.01) mg/L。分组投喂不同添加量转基因米糠的饲料 38 d 后,进行嗜水气单胞菌攻毒。

饲料中水分含量测定 测定方法参照 GB 6435-86《饲料水分的测定方法》。

米糠和饲料中霉菌和细菌计数 测定米糠存放 3 个月后,霉菌与细菌增殖情况。

取适量饲料于恒温培养箱 28 °C 条件下保存,培养连续计数 0、10、20、30、60 d 的霉菌与细菌增殖情况。另取饲料适量,分别用灭菌水补充水分至 15%,密封保存置于恒温培养箱中,设定温度为 28 °C,计数 0、5、10、20 d 的霉菌与细菌增殖情况。

测定方法参照标准 GB 13093-91《饲料中细菌总数的测定方法》与 GB/T 13092-2006《饲料中霉菌总数的测定》。

肠道内大肠杆菌与乳酸菌计数 每组随机取两尾吉富罗非鱼活体,鱼体用 75% 的酒精消毒,在超净台上无菌分离肠道内容物,将内容物放到预先称重的 1.5 mL 无菌离心管中,每两尾鱼的相应肠段内容物为一个样品,准确称出肠内容物重量,按 1:10 加入生理盐水,梯度稀释,进行大肠杆菌和乳酸菌计数。

攻毒 嗜水气单胞菌接种于营养琼脂培养基进行菌苗的复壮,挑取少量菌落于营养肉汤培养基中,30 °C 培养过夜,灭菌生理盐水清洗,4 000 r/min,离心 5 min,收集菌体用生理盐水稀释到适宜浓度。各实验组与 CK1 组用无菌注射器从肛门 5 mm 处向腹腔注射 10^6 CFU/g 鱼体的嗜水气单胞菌,CK2 为空白对照,注射等体积生理盐水。统计 7 d 的累计死亡数。攻毒期间,继续投喂各组饲料。

中肠切片 在攻毒以前,每组随机抽取两尾鱼解剖,每尾取 2~3 段中肠置于预先加入 800 μ L Carnoy 氏固定液的 1.5 mL 离心管,固定 24 h 后,上行梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制作切片(横切),厚度为 5 μ m。攻毒后,各组选取两尾刚致死病鱼,处理同上。常规苏木精-伊红染色,中性树胶封片后,光学显微观察切片并拍照,观察倍数为 10 \times 40 倍。

数据统计与分析 采用 SPSS 16.0 软件进

行单因素方差(One-Way ANOVA)分析,结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 对虾素转基因米糠对饲料中微生物增殖的抑制作用

转基因米糠和非转基因米糠中微生物增殖情况 米糠中水分含量测定为 8% 左右,室温放置 3 个月后,其中细菌和霉菌计数结果见表 2。

表 2 米糠中微生物增殖
Tab. 2 The multiplication of microbiota in rice bran
CFU/g, $\alpha = 0.05$

时间/d time	微生物 microbiota	组别 group	
		转基因米糠 transgenic rice bran	非转基因米糠 non-transgenic rice bran
0	细菌($\times 10^3$) bacteria	7.96 \pm 5.16 ^a	8.73 \pm 0.85 ^a
	霉菌($\times 10^3$) mold	6.03 \pm 0.20 ^a	6.32 \pm 0.41 ^a
90	细菌($\times 10^4$) bacteria	7.72 \pm 1.12 ^b	92.6 \pm 10.5 ^a
	霉菌($\times 10^4$) mold	4.05 \pm 0.59 ^b	27.0 \pm 7.21 ^a

注:同一行中字母不同表示差异显著。

Notes: In a row, data followed by a different letter are significantly different at 5% level.

含对虾素 3-2 转基因米糠组与非转基因对照米糠组中霉菌与细菌在实验开始时差异不显著,而 90 d 增殖数经 *t* 检验发现,均差异显著($P < 0.05$),其中细菌总数超过 10 倍以上,霉菌总数超过 6 倍以上,表明含对虾素的转基因米糠对霉菌和细菌增殖具有明显的抑制作用。

对虾素转基因米糠对饲料中微生物增殖的影响 添加不同比例转基因米糠的罗非鱼饲料 28 °C 条件下保存 2 个月,其中水分含量经过测定为 6% 左右,分别于 0、10、20、30、60 d 测定其细菌和霉菌总数,测定结果见表 3。

各组饲料补充水分至 15% 后,28 °C 条件保存,分别于 0、5、10、20 d 测定其细菌和霉菌总数(表 4)。

自然条件和补充水分条件下的细菌与霉菌计数均表明:在饲料中添加转基因米糠对饲料中细菌与霉菌增殖有显著的抑制作用;不同转基因米糠的添加量,抑菌强度不同;在本实验中,3#组添加的转基因米糠最多,抑菌效果最好,2#组抑菌效果次之。

表 3 转基因米糠对饲料中微生物增殖的影响
Tab.3 The effect of transgenic rice bran on microbial community in feed CFU/g, $\alpha = 0.05$

时间/d time	微生物 microbiota	组别 group			
		1	2	3	CK
0	细菌 ($\times 10^4$) bacteria	5.38 \pm 0.18 ^a	4.15 \pm 1.07 ^a	5.03 \pm 0.49 ^a	4.80 \pm 0.47 ^a
	霉菌 ($\times 10^3$) mold	2.71 \pm 0.44 ^a	3.24 \pm 0.11 ^a	2.66 \pm 0.93 ^a	2.89 \pm 1.91 ^a
10	细菌 ($\times 10^5$) bacteria	1.71 \pm 0.22 ^{ab}	1.42 \pm 0.18 ^b	1.18 \pm 0.16 ^b	2.26 \pm 0.44 ^a
	霉菌 ($\times 10^3$) mold	5.32 \pm 1.20 ^b	5.14 \pm 0.33 ^b	4.79 \pm 0.16 ^b	7.59 \pm 0.50 ^a
20	细菌 ($\times 10^5$) bacteria	3.42 \pm 1.20 ^b	2.41 \pm 0.31 ^b	1.66 \pm 0.06 ^b	6.04 \pm 0.59 ^a
	霉菌 ($\times 10^3$) mold	9.34 \pm 0.30 ^b	7.01 \pm 1.58 ^b	6.17 \pm 0.20 ^b	19.6 \pm 2.54 ^a
30	细菌 ($\times 10^5$) bacteria	4.19 \pm 0.54 ^b	3.25 \pm 0.42 ^b	3.09 \pm 0.10 ^b	13.2 \pm 0.42 ^a
	霉菌 ($\times 10^4$) mold	2.68 \pm 0.69 ^b	1.72 \pm 0.33 ^b	1.17 \pm 0.34 ^b	5.18 \pm 1.00 ^a
60	细菌 ($\times 10^5$) bacteria	7.10 \pm 0.69 ^b	5.38 \pm 0.52 ^b	3.63 \pm 0.12 ^b	21.0 \pm 2.69 ^a
	霉菌 ($\times 10^4$) mold	4.76 \pm 1.22 ^b	2.82 \pm 0.18 ^{bc}	1.32 \pm 0.13 ^c	8.95 \pm 1.16 ^a

注:1#转基因米糠含量为 10% ;2#转基因米糠含量为 20% ;3#转基因米糠含量为 30% ;CK 添加 20% 非转基因米糠。同一行中字母不同表示差异显著。

Notes: The content of transgenic rice bran in 1#, 2# and 3# is 10% , 20% and 30% respectively. CK is added 20% normal rice bran. In a row, data followed by a different letter are significantly different at 5% level.

表 4 水分含量为 15% 条件下转基因米糠对饲料中微生物增殖的影响

Tab.4 The effect of transgenic rice bran on microbial community in feed after adding water to 15% CFU/g, $\alpha = 0.05$

时间/d time	微生物 microbiota	组别 group			
		1	2	3	CK
0	细菌 ($\times 10^4$) bacteria	3.62 \pm 1.81 ^a	4.11 \pm 0.80 ^a	3.48 \pm 0.34 ^a	3.85 \pm 0.87 ^a
	霉菌 ($\times 10^3$) mold	1.77 \pm 0.67 ^a	1.79 \pm 0.23 ^a	2.28 \pm 0.59 ^a	2.41 \pm 0.77 ^a
5	细菌 ($\times 10^5$) bacteria	1.06 \pm 0.20 ^b	0.78 \pm 0.05 ^b	0.76 \pm 0.07 ^b	1.93 \pm 0.44 ^a
	霉菌 ($\times 10^4$) mold	2.10 \pm 0.13 ^b	1.91 \pm 0.06 ^b	1.08 \pm 0.17 ^b	3.63 \pm 1.05 ^a
10	细菌 ($\times 10^5$) bacteria	3.64 \pm 0.35 ^b	2.05 \pm 0.20 ^b	1.32 \pm 0.04 ^b	11.6 \pm 4.09 ^a
	霉菌 ($\times 10^4$) mold	7.41 \pm 0.25 ^b	4.49 \pm 0.59 ^{bc}	2.30 \pm 0.02 ^c	13.3 \pm 2.19 ^a
20	细菌 ($\times 10^5$) bacteria	22.1 \pm 0.78 ^b	6.83 \pm 1.32 ^{bc}	2.76 \pm 0.27 ^c	53.4 \pm 13.7 ^a
	霉菌 ($\times 10^5$) mold	2.76 \pm 0.27 ^b	1.55 \pm 0.10 ^b	0.75 \pm 0.10 ^b	6.98 \pm 2.45 ^a

注:1#转基因米糠含量为 10% ;2#转基因米糠含量为 20% ;3#转基因米糠含量为 30% ;CK 添加 20% 非转基因米糠。同一行中字母不同表示差异显著。补充水分至 15% 的饲料, 28 $^{\circ}$ C 保存 23 d 后陆续发生霉变现象, 饲料变质、长满白色真菌菌丝。同一行中字母不同表示差异显著。

Notes: The content of transgenic rice bran in 1#, 2# and 3# is 10% , 20% and 30% respectively. CK is added 20% normal rice bran. In a row, data followed by a common letter are significantly different at 5% level. Feed added water were kept at 28 $^{\circ}$ C. 23 days later, they became mildewed in succession. In a row, data followed by a different letter are significantly different at 5% level.

2.2 对虾素转基因饲料对罗非鱼攻毒的保护效果

对实验罗非鱼进行嗜水气单胞菌攻毒(攻毒剂量为 10^6 CFU/g 鱼体)1 d 以后, 罗非鱼开始发病死亡, 主要症状表现为体表出血明显, 上下颌、眼睛、鳃盖、鳍基及尾鳍末端充血发红, 肛门红肿外突, 腹部肿大, 解剖发现腹腔积水, 肝胰腺肿大。各组罗非鱼 7 d 累计死亡率见表 5。攻毒结果表明, 投喂含对虾素 3-2 转基因米糠饲料的罗非鱼死亡率显著低于对照组, 但存活率并不与添加量成线性关系, 在本实验所选质量比梯度中, 20% 添加量对罗非鱼保护效果最好。

表 5 注射嗜水气单胞菌后吉富罗非鱼 7 d 累计死亡率

Tab.5 The mortality rate of GIFT
%, $\alpha = 0.05$

	组别 group			
	1	2	3	CK
死亡率 mortality	23.20 \pm 5.54 ^c	15.77 \pm 5.64 ^c	35.28 \pm 3.83 ^b	61.40 \pm 7.96 ^a

注:1#转基因米糠含量为 10% ;2#转基因米糠含量为 20% ;3#转基因米糠含量为 30% ;CK 添加 20% 非转基因米糠。同一行中字母不同表示差异显著。

Notes: The content of transgenic rice bran in 1#, 2# and 3# is 10% , 20% and 30% respectively. CK is added 20% normal rice bran. In a row, data followed by a different letter are significantly different at 5% level.

2.3 转基因饲料对两类罗非鱼肠道微生物的影响

检测了添加对虾素 3-2 转基因米糠对肠道乳酸菌群和大肠杆菌的影响,结果如表 6 所示。从表 6 可以看出,乳酸菌菌群数量差异显著($P < 0.05$),其中 2#组与对照差组异极显著($P < 0.01$);大肠杆菌菌群数量差异显著($P < 0.05$),3#组大肠杆菌数最低。

2.4 转基因饲料对罗非鱼肠道组织结构的影响

攻毒前,中肠切片显示:各处理组罗非鱼肠黏膜形态结构都较为完整,层次分明,肠黏膜上皮细胞的轮廓清晰,染色鲜明,上皮淋巴细胞位于上皮基膜上面的肠绒毛上皮柱状细胞之间,分别位于柱状细胞核上区、核区与核下区,核深染。统计 100 个柱状细胞内上皮内淋巴细胞数量,发现各实验组淋巴细胞($111 \pm 7.07, 126 \pm 10.6, 113 \pm 2.12$)均明显高于对照组(74 ± 4.95)($P < 0.05$),各实验组之间差异不显著。但 3#实验组罗非鱼

黏膜上皮部分柱状细胞近游离缘部分出现空泡变性。部分典型切片的显微(10×40 倍)图片如图 1 所示。

表 6 转基因米糠对罗非鱼中肠道微生物的影响结果
Tab. 6 The effect of transgenic rice bran on gut microbiota $\alpha = 0.05$

组别 group	菌落数/(CFU/g) bacterial colony	
	乳酸菌($\times 10^5$) lactobacillus	大肠杆菌($\times 10^3$) <i>Escherichia coli</i>
1#	1.56 ± 0.26^b	17.4 ± 0.57^b
2#	3.24 ± 0.21^a	5.75 ± 1.66^c
3#	1.47 ± 0.38^b	3.64 ± 0.23^c
CK1	0.89 ± 0.09^b	26.6 ± 5.16^a

注:1#转基因米糠含量为 10%;2#转基因米糠含量为 20%;3#转基因米糠含量为 30%;CK 添加 20% 非转基因米糠。同一列中字母不同表示差异显著。

Notes: The content of transgenic rice bran in 1#, 2# and 3# is 10%, 20% and 30% respectively. CK is added 20% normal rice bran. In a row, data followed by a different letter are significantly different at 5% level.

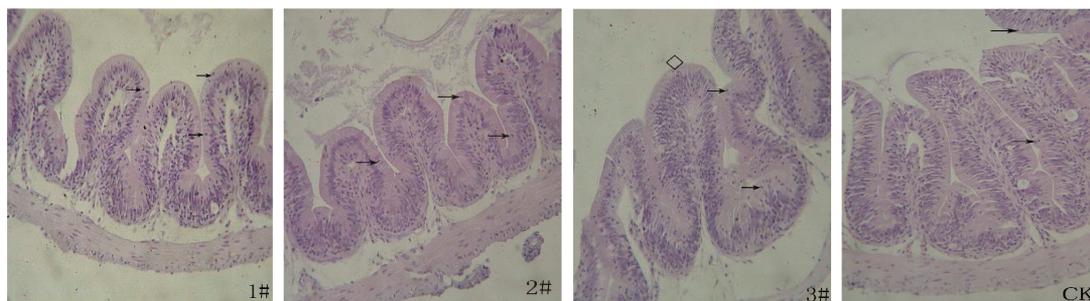


图 1 嗜水气单胞菌攻毒之前罗非鱼肠道结构

“→”所标识位置为上皮内淋巴细胞,“◇”标识位置为空泡变性的柱状细胞。

Fig. 1 Before being challenged with live *Aeromonas hydrophila*, the gut structure of GIFT

“→” indicate Intraepithelial Lymphocyte, “◇” indicate denatured columnar cell.

嗜水气单胞菌攻毒后,与未攻毒健康罗非鱼中肠相比:各组实验鱼肠腔内出现成团脱落的黏膜上皮;固有层到浆膜范围出现纤维组织细胞增生。其中对照 CK 组黏膜上皮脱落最为明显,绒毛受损最为严重,纤维组织细胞增生最为显著;而实验组与对照组相比相关症状明显较轻,2#实验组黏膜上皮细胞受损程度小且纤维质增生程度较小。典型图片如图 2 所示。

3 讨论

抗菌肽类物质替代抗生素的研究是近几年研究的一个热点。目前开发利用抗菌肽的途径主要利用工程菌重组表达抗菌肽,然后对表达产物进

行分离纯化。但是存在产率低,后处理工艺复杂等问题。本研究在国内首次尝试利用植物生物反应器表达抗菌肽类物质应用于水产养殖病害的防治。植物生物反应器是生物技术实际应用的重要领域,也是使传统农产品提高附加值的重要途径,因此被称为“分子农业”^[11]。对于生产具有强烈抗菌抑菌活性的抗菌肽类物质,使用植物生物反应器可以避免产物本身对原核和真核工程菌的裂解,从而无需增加保护性基因即可直接表达,保证产物活性,减少工艺步骤,降低生产成本。在本研究中,携带对虾抗菌肽的转基因米糠显著提高了吉富品系罗非鱼对嗜水气单胞菌侵染的抵抗能力,这与姜珊等^[12]对酵母重组表达抗菌肽的研究

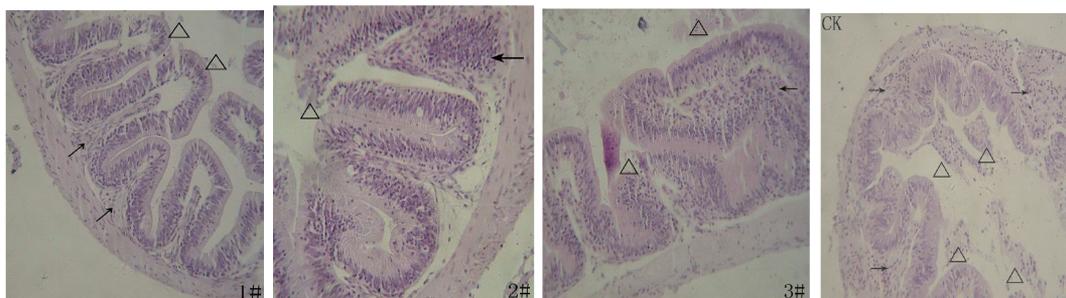


图2 嗜水气单胞菌攻毒之后罗非鱼肠道结构

“→”所标识为罗非鱼肠道纤维组织增生,“△”所标识为脱落的肠道上皮细胞。

Fig. 2 After being challenged with live *Aeromonas hydrophila*, the gut structure of GIFT

“→”indicate proliferation of fibrous tissue, “△”indicate epithelium which broke off.

结果一致,表明用植物生物反应器开发具有抑菌抗病效果的功能性饲料添加剂具有一定的可行性。

由于抗菌肽对微生物具有直接的杀灭作用,饲料中添加抗菌肽可以有效抑制其中微生物的增殖,其效果与抗菌肽的抑菌活性和抑菌谱直接相关。何丹林等^[13]发现在饲料中添加蚕抗菌肽AD-酵母制剂(CADYP)能有效地抑制饲料中细菌的繁殖,但对饲料中霉菌繁殖无抑制作用。来源于对虾的对虾素类抗菌肽同时具有抑制多种细菌和真菌的作用^[8]。本研究发现对虾素3-2转基因米糠与添加转基因米糠制成的饲料中的霉菌与细菌增殖均受到明显的抑制作用,可见表达对虾抗菌肽的转基因米糠对于延缓饲料腐败变质,保障饲料安全起到重要作用。

本课题组前期研究发现毕赤酵母重组对虾素3-2对嗜水气单胞菌的具有较好的体外抑菌效果,可以有效防治罗非鱼嗜水气单胞菌肠炎^[12]。通过微生物基因工程获得的重组表达抗菌肽可以有效防治某些养殖动物病害,如Shockey等^[14]在凡纳滨对虾的攻毒实验中,发现crustin对革兰氏阴性菌*Vibrio penaeicida*作用明显,显著降低了感染后的死亡率。在对幼鼠脓毒症治疗实验中发现低浓度剂量抗菌肽11-37能有效抑制病原菌,治疗幼鼠脓毒症,但较高剂量在治疗中会起到有害作用^[15]。本研究中,罗非鱼腹腔注射嗜水气单胞菌后,添加转基因米糠的实验组最终死亡率明显低于对照组,但是高剂量添加转基因米糠(30%)并没有提高防治效果。

抗菌肽对动物机体的保护作用机理是多方面的,不仅可以直接杀灭入侵的病原菌,而且能够调

节机体的免疫反应^[16-17]。在本研究中,由于嗜水气单胞菌感染罗非鱼首先引发肠炎症状,我们从罗非鱼肠道微生物菌群和罗非鱼中肠结构两个方面分析了转基因米糠保护罗非鱼抵抗嗜水气单胞菌感染的部分机理。通过肠道微生物菌群的分析发现,饲料中添加转基因米糠明显促进了罗非鱼肠道乳酸菌增殖,而对大肠杆菌(革兰氏阴性)繁殖有抑制作用,实验结果与谢海伟等人研究成果一致。谢海伟等^[18]发现通过饲喂鲎素抗菌肽可以改变小鼠肠道中微生物菌群关系,饲喂鲎素后,肠道益生菌乳酸菌菌群的数量较对照组中有所提高;而肠道致病菌沙门菌菌群数量明显减少;姜兰等^[19]研究发现抗菌肽对水产养殖常见病原菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)等革兰氏阴性菌有较好的抑菌效果。Imjongjirak等^[16]发现抗菌肽 arasin-likeSp 对革兰氏阳性菌和阴性菌都有抑制作用,而抗菌肽 GRPSP 仅对革兰氏阳性菌有明显的抑制作用,对革兰氏阴性菌作用并不明显。可见米糠中含有的对虾素3-2可以通过调节肠道菌群来发挥保护作用。摄食转基因米糠的罗非鱼肠道具有更加稳定和健康的菌群,使入侵的嗜水气单胞菌不易定殖和增殖,从而起到明显的保护作用。石蜡切片结果显示在罗非鱼生长过程中,对虾素3-2能刺激罗非鱼肠道淋巴细胞数量增加,对肠道淋巴细胞的发育有一定的调节作用,从而对罗非鱼肠道产生一定的保护作用,这一结果与罗非鱼攻毒死亡率相一致。值得注意的是过量添加对虾素转基因米糠会损伤黏膜柱状细胞,造成柱状细胞空泡化,从而影响对虾素对肠道的保护效果。抗菌肽的细胞毒性在以前的资料中时有报道,也是限制其应用的重要因素,还需要再

实际应用中加以注意。

总之,本研究使得抗菌肽转基因植物不仅自身抗病性有所提高,而且其副产物可以用作功能性饲料添加剂,防治养殖动物病害以及用于饲料防腐防霉,是利用植物生物反应器开发抗菌肽类物质防治水产动物病害的一次有意义的尝试,为抗菌肽的开发利用提供了一种新的思路。

参考文献:

- [1] Hancock R E W, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses [J]. Trends in Microbiology, 2000, 8(9) : 402 - 410.
- [2] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. Nature, 2002, 415(6870) : 389 - 395.
- [3] Brown K L, Hancock R E W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides [J]. Current Opinion in Immunology, 2006, 18(1) : 24 - 30.
- [4] 李晓华,陶冉,孙杰. 对虾抗菌肽的研究进展及其在水产养殖业的应用前景 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1) : 167 - 168.
- [5] 叶星,白俊杰. 抗菌肽的研究及其在水产上的应用前景 [J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(4) : 274 - 279.
- [6] 宋理平,胡斌,王爱英,等. 抗菌肽对凡纳滨对虾生长和机体免疫的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(3) : 28 - 32.
- [7] Kang C J, Xue J F, Liu N, et al. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(7) : 1535 - 1543.
- [8] Cuthbertson B J, Bullesbach E E, Gross P S. Discovery of synthetic penaeidin activity against antibiotic-resistant fungi [J]. Chemical Biology & Drug Design, 2006, 68(2) : 120 - 127.
- [9] Li L, Wang J X, ZHAO X F, et al. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expr Purif, 2005, 39(2) : 144 - 151.
- [10] 王维,吴超,刘梅,等. 转中国对虾抗菌肽基因水稻抗白叶枯病效应初析 [J]. 中国水稻科学, 2010, 24(4) : 335 - 340.
- [11] Ma J K C, Barros E, Bock R, et al. Molecular farming for new drugs and vaccines-Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants [J]. EMBO Rep, 2005, 6(7) : 593 - 599.
- [12] 姜珊,王宝杰,刘梅,等. 饲料中添加重组抗菌肽对吉富罗非鱼生长性能及免疫力的影响 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(6) : 1 - 7.
- [13] 何丹林,温刘发,邓春柳,等. 蚕抗菌肽 AD-酵母制剂对粤黄鸡肠道消化酶和饲料品质的影响 [J]. 中国家禽, 2004, 26(7) : 9 - 10.
- [14] Shockey J E, O' Leary N A, de I V E, et al. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(5) : 668 - 673.
- [15] Fukumoto K, Nagaoka I, Yamataka A, et al. Effect of antibacterial cathelicidin peptide CAPI8/LL-37 on sepsis in neonatal rats [J]. Pediatric Surgery International, 2005, 21(1) : 20 - 24.
- [16] Imjongjirak C, Amparyup P, Tassanakajon A. Two novel antimicrobial peptides, arasin-likeSp and GRPSp, from the mud crab *Scylla paramamosain*, exhibit the activity against some crustacean pathogenic bacteria [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 30(2) : 706 - 712.
- [17] 姚俊,王德成,余锐萍,等. 猪小肠抗菌肽对 SPF 鸡肠道黏膜免疫功能的影响 [J]. 科学技术与工程, 2009, 9(17) : 4918 - 4923.
- [18] 谢海伟,文冰,孙兰萍,等. 鲨素抗菌肽饲喂小鼠对小鼠肠道微生物菌群的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(11) : 982 - 987.
- [19] 姜兰,白俊杰,邓国成,等. 重组抗菌肽的制备及其对水产养殖中常见病原菌的抑菌效果 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(1) : 153 - 156.

The effect of transgenic rice carrying antimicrobial gene of shrimp on feed spoilage and disease control in GIFT

GONG Kui^{1,3}, WANG Lei¹, FU Ya-ping², WANG Bao-jie¹,
LIU Wen-zhen², JIANG Ke-yong¹, LIU Mei^{1*}

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China;

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Recently, more and more studies focus on the application of antimicrobial peptides to control bacterial diseases. For the first time, we report the using of plant bioreactor to develop functional feed additives in China. During our previous work, the penaeidin 3-2 gene from the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* was transformed into rice *Aichi ashahi*. Tilapia feed which contained different levels of the transgenic or non-transgenic rice bran were tested for the effect of antimicrobial peptide expressed by rice plant on feed spoilage and disease control. The results of total bacteria and mold count showed that penaeidin 3-2 expressed in rice could effectively restrain growth of microorganisms in feed and bran. Another experiment was conducted to study the effect of different levels of transgenic rice bran (10%, 20%, 30%, respectively) on survival rate of tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. The results showed that survival rates of tilapia fed transgenic rice bran were significantly higher than those fed non-transgenic rice bran. In-depth study of the mechanism of enteritis control by transgenic bran was conducted by studying the gut microbial community and intestinal structure. The results showed that transgenic rice bran restrained growth of *Escherichia coli*, but enhanced lactic acid bacteria proliferation. And the intestinal structure of those fish fed transgenic bran was more intact than the control. So it is indicated that the disease control effect could be in connection with the change of gut microbial community and protective effect of intestinal structure. But it is noteworthy that the excessive addition of transgenic rice bran (30%) could cause epithelial cells degeneration.

Key words: penaeidin 3-2; transgenic rice; aquafeed; genetic improvement of farmed tilapia (GIFT); *Aeromonas hydrophila*; intestinal gut microbiota

Corresponding author: LIU Mei. E-mail: liumei@ms.qdio.ac.cn