

微生物多肽对黑鲷免疫和生长的促进作用*

IMMUNOSTIMULATING AND GROWTH PROMOTING EFFECTS OF MICROBIAL IMMUNOACTIVE POLYPEPTIDES ON *Sparus macrocephalus*

刘清海¹ 冯 静¹ 李 健² 马向东² 马桂荣¹

(¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(² 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

关键词 微生物免疫多肽, 促生长, 促免疫

随着渔业养殖的规模化和集约化的发展, 各种鱼病的爆发成了影响渔业养殖的制约因素之一, 对鱼病防治与控制问题也相应突出出来。研究安全、有效抗病药物和添加剂十分重要。据 Raa 等 1992 年报道, 疫苗能降低水产养殖动物爆发疾病的危险, 但现有疫苗特异性强, 尚无一种抗多种重要流行疾病的有效疫苗。抗生素和其他化学药物可用来避免和控制鱼类的急性感染, 但是由于药物残留、环境污染、细菌抗药性等问题, 使其应用受到限制^[2], 因此免疫增强剂的应用越来越受到人们的重视。免疫增强剂可以不同程度增强鱼类非特异性免疫功能和对疾病抵抗力。这些免疫增强剂包括: 葡聚糖^[2-5]、肽聚糖^[2]、脂多糖^[2]、细菌 DNA^[2]、病毒双链 RNA^[2]、几丁质(据 Sakai 1992 年报道)、鸡蛋产物(据 Yoshida, Y. 等 1993 年报道)、维生素^[5, 6]、矿物质(据 Hossain 1992 年报道)、激素(据 Karjita, Y. 等 1992 年报道)、左旋咪唑^[7]等。这些免疫增强剂主要是一些细胞成分、化学物质或存在于天然物质中, 存在着来源、提取或合成等问题, 且免疫增强作用多通过注射方式实现, 实施起来费时费力。微生物

免疫多肽是一种微生物发酵产物, 通过生物工程技术可以实现低成本、大规模生产。它的主要成分为多肽, 初步实验证明口服微生物免疫多肽可以促进对虾的生长和增强免疫能力。本实验的主要目的是初步探讨口服微生物免疫多肽对鱼类生长和免疫能力的影响作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物与饲喂条件

实验在黄海水产研究所青岛小麦岛培养殖基地进行。黑鲷(*Sparus macrocephalus*, 训养, 均重 51.27 ± 5.29 g), 共 64 尾, 200 L 桶养(每桶 8 尾), 连续充气, 每天上午 8:00 时投饵, 以略有剩饵为度, 摄食结束后换水(沙滤海水)。实验期: 1999 年 5 月 25 ~ 6 月 28 日, 水温 21.99 ± 1.21 °C。

1.2 实验设计

共分 4 组, 如表 1。饲喂 30 d 后, 测定各组样本生长指标和免疫指标。

1.3 样本血清采集与保藏

表 1 实验分组和药物添加量

编号	组别	黑鲷尾数	基本饵料	添加物	添加比例(%)
A	空白对照	16	鲜杂鱼	无	无
B	阳性对照	16	鲜杂鱼	“渔歌”牌添加剂	推荐量(0.1)
C	多肽 I	16	鲜杂鱼	微生物免疫多肽 I	2
D	多肽 II	16	鲜杂鱼	微生物免疫多肽 II	2

注: 阳性对照组中所用添加剂为“宝来利来股份有限公司水产药品事业部(青岛)”的“渔歌”牌水产动物饵料添加剂, 批准文号为鲁药添字(1999)20871。

* 山东省计委重大基金项目。中国水产科学研究院黄海水产研究所病害室黄健研究员对本实验提供了无私的设备支持, 谨在此表示诚挚的感谢。

收稿日期: 1999-10-22;

修回日期: 2000-02-14

每组随机捞取黑鲷,断尾采血,全血于室温下静置 1 h,4 ℃静置 6 h,3 000 r/min(600 g)离心 5 min,取上清液,分装,-20 ℃保藏至分析化验。

1.4 免疫指标测定

1.4.1 溶菌酶活力测定 微板比浊法^[8]溶壁微球菌冻干粉(Sigma)悬液(0.25 mg/ml buffer,buffer为含 0.5% NaCl,pH=6.2,0.05 mol/L磷酸钾盐缓冲液),加入微量培养板各孔中(每孔 190 μl),25 ℃轻微振荡 40 min,尔后各加入 10 μl 待测血清,振荡 1 min,于酶标仪(Microplate Reader, Model 550, BIO RAD, USA)上读出 450 nm 处 OD 值,立即至于 25 ℃环境中,轻微振荡反应 20 min 后,迅速置于酶标仪上,记录读数。以含 0.5% NaCl,pH=6.2,0.05 mol/L 的磷酸钾盐缓冲液为空白。每个血清样本设 5 个重复,取平均值,计算酶活力,一个酶活力单位定义为:该条件下每分钟使反应液 450 nm OD 值下降 0.001 的酶量。

1.4.2 溶血素效价 倍比稀释法(据 Blazer V.S. 等 1984 年报道)。取微量培养板,各孔加入 20 μl 生理盐水,将待测血清做倍比稀释(终体积为 20 μl),再加入 20 μl 2% 人红细胞(海军 401 医院放射免疫中心提供)悬液(溶于生理盐水),振荡片刻,室温静置 2 h,观察记录结果,溶血素效价以能引起至少一半红细胞溶解的血清最高稀释度表示。

表 3 处理 1 个月后体重与饲料系数情况

编号	组别	黑鲷尾数	体重(g)	体重增长(g/尾)	总重增长(g/组)	投饵量(g/组)	饲料系数
A	空白对照	12	58.29 ± 4.75	7.0	84.0	1 425	16.96
B	阳性对照	12	65.07 ± 8.26*	13.8	165.6	1 700	10.27
C	多肽 I	12	63.35 ± 7.06*	12.1	145.2	1 910	13.15
D	多肽 II	12	67.13 ± 7.09*	15.9	190.8	1 850	9.70

注:黑鲷初始均重为 51.27 ± 5.42 g,* 表示某一指标与空白对照组比较差异显著(P < 0.05)。

组、多肽 I 组次之,空白对照组最高。

2.2 微生物多肽的促免疫作用

2.2.1 溶菌酶活力和溶血素效价 如表 4 所示,多肽 I 组及多肽 II 组的溶菌酶活力极显著高于空白对照组(P < 0.01);多肽 II 组的溶菌酶活力极显著高于阳性对照组;阳性对照组高于空白对照组,但无显著性差异。各组的溶血素效价无显著差异。

2.2.2 对免疫因子(IgG, IgM, IgA, C3, C4)的影响 结果如表 5 所示,多肽 I 组、多肽 II 组、阳性对照

1.4.3 免疫因子 免疫消浊比浊法^[1]。取 50 μl 血清加入 500 μl 生理盐水中,混匀,输入全自动生化分析仪(OLYMPUS, JAPAN)分析打印结果。事先设定程序如表 2 所示。

1.5 统计学分析

观测值以平均值 ± 标准差表示,运用 Excel 97 (Microsoft, USA)对各处理组间做学生氏 t 检验(双样本等方差假设)。

表 2 免疫因子测定实验设定程序

免疫因子	稀释血清(μl)	抗血清(μl)	反应时间(s)	波长(cm)
IgG	3	300	160	340
IgM	24	300	200	340
IgA	12	300	220	340
C3	25	300	200	340
C4	30	300	210	340

2 实验结果

2.1 微生物免疫多肽的促生长作用

如表 3 所示,多肽 I、多肽 II 均有明显的促生长的效果。多肽 I 组、多肽 II 组平均体重显著高于空白对照组(P < 0.05),但与阳性对照组相比差异不显著;饲料系数则以实验 II 组(多肽 II)最低,阳性对照

组的 5 项免疫因子均高于空白对照组相应项。各组间

表 4 处理 1 个月后的溶菌酶活力和溶血素效价

编号	组别	黑鲷尾数	溶菌酶活力	溶血素效价
A	空白对照	5	42.10 ± 12.29	9.6 ± 3.58
B	阳性对照	5	69.76 ± 29.82	6.4 ± 2.19
C	多肽 I	5	88.97 ± 11.39**	6.4 ± 2.19
D	多肽 II	5	197.81 ± 52.01***	9.6 ± 3.58

注:** 表示某一指标与空白对照组比较差异极显著(P < 0.01),+ + 表示某一指标与阳性对照组比较差异极显著(P < 0.01)。

的 IgG, IgA 无显著差异; 多肽 I 组的 IgM 极显著高于空白对照组的 IgM ($P < 0.01$), C3, C4 显著高于空白对照组的相应项 ($P < 0.05$); 多肽 II 组的 IgM, C3, C4 极显著高于空白对照组的相应项; 阳性对照组的

IgM, C3 极显著高于空白对照组的 IgM, C3 含量; 多肽 I 组与多肽 II 组大部分测定项目高于阳性对照组的相应项, 但除多肽 II 组的 C3 含量显著高于阳性对照组外, 其他差异均不显著。

表 5 处理 1 个月后的免疫因子

编号	组别	黑鲟尾数	IgG 含量 (g/L)	IgM 含量 (g/L)	IgA 含量 (g/L)	C3 含量 (g/L)	C4 含量 (g/L)
A	空白对照	4	0.683 ± 0.310	0.68 ± 0.044	0.323 ± 0.065	0.115 ± 0.031	0.020 ± 0.010
B	阳性对照	4	1.183 ± 0.402	1.318 ± 0.131**	0.385 ± 0.086	0.190 ± 0.022**	0.075 ± 0.064
C	多肽 I	4	1.255 ± 0.408	1.423 ± 0.390**	0.528 ± 0.179	0.433 ± 0.225*	0.105 ± 0.063*
D	多肽 II	4	0.908 ± 0.200	1.480 ± 0.352**	0.425 ± 0.122	0.483 ± 0.170***	0.113 ± 0.038**

注: * 表示某一指标与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示某一指标与空白对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$), + 表示某一指标与阳性对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 两种微生物免疫多肽的促生长、促免疫作用评价

两种微生物免疫多肽均具有明显的促生长、促免疫作用。黑鲟口服 2% 的多肽 II, 较空白对照组饲料系数降低 42.8%, 平均体重提高 15.2%, 极显著提高血清中的溶菌酶活力及 IgM, C3, C4 等免疫因子的含量 ($P < 0.01$), 和阳性对照组相比, 平均体重提高 3.2%, 饲料系数降低 5.6%, 血清中的溶菌酶活力极显著提高 ($P < 0.01$), C3 含量显著提高 ($P < 0.05$)。黑鲟口服 2% 的多肽 I, 较空白对照组平均体重提高 8.7%, 饲料系数降低 22.5%, 极显著提高血清中的溶菌酶活力及血清中 IgM 含量 ($P < 0.01$), 显著提高血清中 C3, C4 含量 ($P < 0.05$), 多肽 I 组与阳性对照组的各项比较差异不显著。综合以上结果可以看出, 多肽 II 的促生长、促免疫作用大于多肽 I 和“渔歌”, 多肽 I 和“渔歌”相比则无显著差异。

3.2 测定方法、结果分析

3.2.1 溶菌酶活力 本文测定黑鲟血清中溶菌酶活力范围为 23 ~ 260 Unit/ml, 而 Lygren B. 等^[9]测定大西洋鲑血清中溶菌酶活力范围在 1 233 ~ 1 412 Unit/ml 之间。究其原因, 可能是种属差异也可能是测定具体条件不一致所致, 如本文采用反应 20 min 而非 5 min 等。

3.2.2 溶血素效价 本文测定的为黑鲟血清中天然溶血素效价, 所以偏低; 而 Blazer V.S. 等 1984 年测定的是为虹鳟注射 2% 绵羊红细胞后血清中溶血素效价, 故而较高。

3.2.3 免疫因子 本文采用免疫消浊比浊法

测定黑鲟血清中免疫因子。免疫消浊比浊法是近年发展起来的, 其基本原理是抗原与相应抗体相遇, 在液相中形成抗原抗体复合物, 从而形成一定浊度, 该浊度与抗体存在时抗原的含量成正比。此法多应用于人血清中免疫因子的测定, 采用的抗体液多为羊抗人的抗体。王伟庆等^[1]借鉴此法, 采用羊抗人的抗体液, 测定中国对虾血清中的免疫因子, 发现中国对虾血清中存在类 IgG 类 IgM 类 IgA 类 C3 类 C4 类 CRP 物质, 并且用此法测定出健康与带病中国对虾血清中的免疫因子含量的差异。本文也采用羊抗人的抗体液, 测定出黑鲟血清中 IgG, IgM, IgA, C3, C4 等因子的存在, 空白对照组与其他组的黑鲟血清中 IgG, IgM, IgA, C3, C4 等因子含量存在一定差异。

参考文献

- 王伟庆等. 水产学报, 1998, 22(2): 170 ~ 174
 - Robertson, B. . *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9: 269 ~ 290
 - Lapatra, S.E. et al. . *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 9: 435 ~ 446
 - Efthimiou, S. . *Journal of Applied Ichthyology*, 1996, 12: 1 ~ 7
 - Vethac, V. et al. . *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8: 409 ~ 424
 - Wahli, T. et al. . *Journal of Fish Diseases*, 1998, 21: 127 ~ 137
 - Milero, V. et al. . *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8: 49 ~ 62
 - Eills, A.E. . *Techniques in Fish Immunology*. U.S.A.: SCS Publications, 1990. 101 ~ 103
 - Lygren, B. et al. . *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9: 95 ~ 197
- (本文编辑: 刘珊珊)