

研究论文与报告

免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究*

刘恒 李光友

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于1995年6月在威海市水产开发公司对虾育苗场采集南美白对虾,经暂养后,选取体长6—7cm的个体,利用由海藻中提取的与微生物多糖有类似结构和性质的免疫多糖作为饵料添加剂,以口服形式对南美白对虾进行免疫,刺激其免疫系统。通过连续测定南美白对虾血清中酚氧化酶活力和肌肉组织液中的抗菌、溶菌活力,以及超氧化物歧化酶活力,研究免疫多糖对南美白对虾免疫功能、机体抗氧化能力的作用。结果表明,除个别情况外,实验组南美白对虾的酚氧化酶活力,溶菌、抗菌活力和超氧化物歧化酶活力,均高于对照组的。由此推断,免疫多糖具有增强南美白对虾免疫功能的作用,并有可能促进其机体的抗氧化能力。

关键词 免疫多糖 南美白对虾 酚氧化酶活力 超氧化物歧化酶活力 溶菌、抗菌活力

学科分类号 S945.1

由中国科学院海洋研究所引进的南美白对虾是目前世界养殖产量最高的三大虾种之一,具有对水环境抗逆能力强、营养要求低、生长速度快、虾体含肉量大等诸多优点¹⁾。该虾种已在我国成功地进行了人工育苗,并于1994—1995年在各地进行了人工养成¹⁾。随着南美白对虾养殖规模的扩大,其防病抗病的研究也日趋重要。就虾病防治而言,目前国内外一些学者从免疫学角度对虾病进行研究,试图通过刺激对虾自身的免疫系统,提高其机体防御能力而达到防治疾病的目的(Bland,1982;叶孝经,1990;王雷等,1994)。但有关南美白对虾在该领域的研究未见报道。本文报告免疫多糖对南美白对虾免疫功能的研究结果,以期探讨定量研究南美白对虾抗病防病能力的指标。

1 材料与方法

1.1 实验材料

南美白对虾(*Penaeus vannamei* Boone,1931)于1995年6月2日取于威海市水产开发公司对虾育苗场,约100尾,规格为3—4cm,暂养于中国科学院海洋研究所水族楼PVC水族缸(100cm×150cm×100cm)内,充气。水温在整个暂养和实验期内均在22—28℃,盐度为32。每天换水两次,每次换水量在1/3—1/2,喂以不添加免疫多糖(IPS)的饵料,

* 国家攀登计划B资助项目,PD B6-6-3号。刘恒,女,出生于1962年11月,博士,副研究员,Fax:0086-0532-2870882

1) 张伟权,1994,南美白对虾半精养生产技术指南。1—26

收稿日期:1995-12-25,收修改稿日期:1997-12-20

每天投喂两次。同年8月18日将体长6—7cm的南美白对虾移入2个等大圆底PVC缸内(直径90cm,高100cm),1个PVC缸为密度实验组,另1为对照组;实验组和对照组均为18尾/缸。管理方法同暂养时,但实验组对虾饵料中添加IPS。

1.2 肌肉匀浆

每10d取样一次,连续3次。每次选蜕皮间期的南美白对虾2—5尾,去头及外壳,称重,加入3.5倍重量的0.1 mol/L的磷酸钾盐缓冲液(pH = 6.4),于4℃的冰箱中静置6h,低温匀浆,离心(5 000 r/min, 5min),将上清液用于溶菌活力(U_L)、抗菌活力(U_a)和超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定。前两次取样后均由暂养池中补足取样用去的对虾,以避免密度变化对实验结果的影响。补入的对虾在尾肢用镊子烫一下以做标记,不用于实验取样。

1.3 取血

同年9月21日再由暂养缸内取6—8cm的对虾,实验设置同“1.2”,但南美白对虾密度为16尾/缸。因实验材料有限,只连续取样两次。用5号针管从虾体心脏中取血,将血液置于Eppendorf管中在冰箱(4℃)内过夜,析出的血清用于酚氧化酶活力测定。

1.4 菌种

大肠杆菌(*E. coli*)、抗链霉素种,由青岛海洋大学提供,用LB培养基于37℃固体斜面培养。

1.5 抗菌活力测定

采用Boman(1974)及Hultmark(1980)等人(此二文献转引自王雷等,1994)的方法。用0.1 mol/L的磷酸钾盐缓冲液(pH = 6.4),从固体斜面上将大肠杆菌洗下作为底物并配成一定浓度的悬浊液($OD_{570} = 0.3—0.5$),取3ml该悬液于度管内置冰浴中,再加入50μl肌肉匀浆上清液混匀,测570nm波长处的初始光密度值(A_0),然后将试液移入37℃温水浴中30min,取出后立即置于冰浴内10min终止反应,测反应后的试液在570nm波长处的光密度值(A)。抗菌活力(U_a)计算见王雷等(1994)。

$$U_a = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A}}$$

为消除干扰,以空白的肌肉匀浆上清液为对照,于570nm处测其光密度值,以校正 A_0 , A 值。

1.6 溶菌活力测定

以溶壁微球菌(*M. lysoleiaticus*)冻干粉(由山东大学提供)为底物,按Hultmark等人(转引自王雷等,1994)的方法,将底物用0.1 mol/L的磷酸钾盐缓冲液(pH = 6.4)配成一定浓度的悬液($OD_{570} = 0.3$)。取3ml该悬液与50μl肌肉匀浆上清液于试管中混匀,测初始光密度值(A_0)后置于37℃水浴保温30min,取出后立即置于冰浴中10min终止反应,测570nm波长处的光密度值(A),溶菌活力(U_L)由下式(王雷等,1994)计算:

$$U_L = \frac{A_0 - A}{A}$$

校正 A_0 , A 的方法同“1.5”。

1.7 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定

按郑碧玉等(1991)¹⁾改良的连苯三酚自氧化法进行。

1.7.1 连苯三酚自氧化速率测定 取 50mmol / L 的磷酸钾盐缓冲液 (pH = 8.0) 4.5ml, 加 50mmol / L 的连苯三酚 10μl, 迅速摇匀, 在 325nm 波长下每隔 30s 测光密度一次, 要求连苯三酚自氧化速率控制 OD 0.07 / min 左右。

1.7.2 样液超氧化物歧化酶(SOD)活力测定 测定方法同“1.7.1”, 只是在加入连苯三酚前加入一定量的待测样液。测得的 SOD 活力按下式计算:

$$\text{酶活力} = \frac{\frac{0.07 - A_{325} / \text{min}}{0.07} \times 100\%}{50\%} \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

每毫升反应液中, 每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量为一个活力单位。

1.8 酚氧化酶(PO)活力的测定

以 L-dopa (Sigma) 为底物, 参照 Ashida (1971) 的方法进行。将 0.1mol / L 的磷酸钾缓冲液 (pH = 6.0) 3ml 先与 0.01 mol / L 的 L-dopa 100μl 混匀, 再加入 100μl 等测血清, 混匀, 于 490nm 波长下, 每隔 2min 读取光密度值。以 OD₄₉₀ 对反应时间作图, 以实验条件下每分钟 OD₄₉₀ 增加 0.001 为一个酶活力单位。为消除血清中血蓝素的干扰, 用空白血清为对照, 于 490nm 处测其光密度值, 以校正样液的光密度值。

2 结果

实验结果表明, 除个别组外(表 2 中 9 月 17 日测定的抗菌活力实验组稍低于对照组), 实验组南美白对虾的酚氧化酶活力、超氧化物歧化酶活力以及溶菌和抗菌活力均高于对照组的, 见表 1、表 2。

表1 IPS 对南美白对虾PO和SOD活力(units)的作用

Tab.1 Effect of IPS on the phenoloxidase and superoxide dismutase activities of *P.vannamei*

| 日期(月-日) | PO | 10-01 | 10-21 | SOD | 08-28 | 09-07 | 09-17 |
|---------|----|-------|--------|-------|--------|--------|--------|
| 实验组 | | 27 | 22 | | 198.58 | 223.41 | 258.16 |
| 对照组 | 18 | 12 | 196.43 | 49.65 | 124.12 | | |

表2 IPS对南美白对虾溶菌活力(U_L)、抗菌活力(U_a)的作用

Tab.2 Effect of immunopoly saccharide on bacteriolytic and antibacterial activities of *P.vannamei*

| 日期(月-日) | 组别 | 08-28 | | 09-07 | | 09-17 | | U _a | 08-28 | | 09-07 | | 09-17 | |
|----------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | 实验 | 对照 | 实验 | 对照 | 实验 | 对照 | | 实验 | 对照 | 实验 | 对照 | | |
| A ₀ | U _L | 0.324 | 0.314 | 0.335 | 0.305 | 0.308 | 0.317 | 0.412 | 0.410 | 0.354 | 0.345 | 0.415 | 0.412 | |
| A | | 0.226 | 0.228 | 0.263 | 0.243 | 0.241 | 0.286 | 0.388 | 0.400 | 0.292 | 0.280 | 0.324 | 0.392 | |
| U _L | | 0.434 | 0.377 | 0.274 | 0.255 | 0.278 | 0.108 | 0.296 | 0.158 | 0.470 | 0.481 | 0.530 | 0.226 | |

3 讨论与结语

3.1 IPS 对溶菌活力、抗菌活力的影响

从表 2 中可以看出, 三次取样测定结果中实验组的溶菌活力均高于对照组的, 第一、

1) 郑碧玉, 1991, 生物化学与生物物理进展, 18(2): 163

三次结果尤其显著。也可以看出,第一次和第三次取样测定结果中,实验组的抗菌活力远高于对照组的,但第二次取样结果实验组稍低于对照组。还注意到,表2第二次取样的溶菌活力,实验组虽高于对照组,但却是三次取样中差异最不显著的,而且这次取样用虾尾数最少(实验组只有3条、对照组只有2条虾处于蜕皮间期可供取样)。故而上述现象可能是取样个体少所致。由于取样次数有限,作者很难对IPS的作用在时间的变化规律上做出定论。而溶菌、抗菌活力的变化还可能受到对虾体质状况和水环境因子的影响。

关于对虾血淋巴中溶菌、抗菌活力的诱导机理,有关学者认为(王雷等,1994),各种致病细菌细胞壁中含的多糖类起重要作用。根据人体免疫研究的结果,许多免疫多糖可作为一种广谱非特异免疫促进剂,增强人体的细胞免疫及体液免疫能力。本研究进一步说明,对虾免疫研究中,免疫多糖的应用将为病害的防治开辟一个新领域。

3.2 IPS对南美白对虾超氧化物歧化酶活力的作用

从表1可以看出,第二、三次取样结果实验组超氧化物歧化酶活力均显著高于对照组的。但第一次取样结果,两者差别并不显著。超氧化物歧化酶是重要的抗氧化酶之一,在清除自由基、防生物分子损伤方面有十分重要的作用,目前已作为抗衰老药物和化妆品成份而应用于人体。近年来的研究发现,超氧化物歧化酶活性与生物的免疫水平密切相关(林林等,1997)。本结果中实验组的超氧化物歧化酶活力在实验开始10d时与对照组的无显著差别,而此时实验组的酚氧化酶活力,溶菌、抗菌活力均已显著高于对照组的,可能表现了IPS对对虾机体超氧化物歧化酶活性作用的间接性而带来的时滞,即它首先影响到虾体的免疫水平,而免疫水平的提高又增强了超氧化物歧化酶活力。当然这只是推测。IPS对对虾机体超氧化物歧化酶活性的影响及其作用机理仍需进行大量深入的工作。

3.3 IPS对酚氧化酶活力的作用

从两次取样测定结果(表1)可以看出,实验组对虾的酚氧化酶活力均显著高于对照组的。关于甲壳动物酚氧化酶系统的研究,主要集中在淡水螯虾上¹⁾。有些学者认为,酚氧化酶以酶原形式存在于甲壳动物血细胞中,微生物入侵后刺激血细胞使该酶原释放到血淋巴中并被激活表现出活性,它与血细胞的吞噬、包裹,以及血淋巴的抗菌活性和对外源物质的识别有关(转引自王雷等,1994)。IPS是由天然活性多糖及其佐剂构成的口服型免疫药物,其化学结构和特性类似于微生物细胞壁所含的多糖。实验结果表明,正常情况下南美白对虾血清中亦存在酚氧化酶活性,这与王雷等(1994)对中国对虾的报道基本一致,但饵料中添加适量的IPS后,这种酶的活性会显著提高。

参 考 文 献

- 王雷 李光友 毛远兴等,1994. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究. 海洋与湖沼,25(5): 486—491
- 叶孝经,1990. 对虾弧菌苗免疫的研究. 海洋水产研究丛刊,32:13—18
- 丁美丽 林林 李光友等,1997. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究. 海洋与湖沼,28(1):7—11
- Ashida M,1971.Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm. *Bombyx Mori Arch Biochem Biophys*, 144:749—762

1) Söderhall K, Cerenius L, 1992. *Annual Rev of Fish Disease*, 3—23

Bland C, 1982. Viral disease control study develops shrimp culture immunization techniques. *Aquaculture Magazine*, May/June: 12—15

THE EFFECT OF IMMUNOPOLYSACCHARIDE AS A FOOD ADDITIVE ON THE PENAEID SHRIMP, *PENAEUS VANNAMEI*

LIU Heng, LI Guang - you

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract Immunopolysaccharide (IPS), a product extracted from sea algae, with the characteristics similar to those of microbial polysaccharides, was used as a food additive to test its effectiveness of antidisease. Around 100 juvenile *Penaeus vannamei* with a body length of 3—4cm were collected from the Shrimp Hatchery of Weihai Aquaculture Company on June 2, 1995, and were then nursed in 4 PVC tanks (100cm × 150cm × 100cm) in the Aquarium of the Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences. Water temperature was kept at 22—28°C, salinity 32. The water was aerated, and changed twice a day (1 / 3—1 / 2 volume of water was renewed each time). No IPS was added in the food during nursery periods.

After nursery, *P. vannamei* with a body length of 6—7cm were shifted to two PVC tanks of the same size (diameter 90cm, height 100cm, one for control, the other for test group, stocking density 18 pieces / tank) on August 18, 1995, when experiments of superoxide dismutase (SOD) activity, bacteriolytic (U_L) and antibacterial (U_a) activities began. The controlled group was fed with food without IPS, while the test group was fed with IPS. The maintenance of shrimps was the same as the nursery period.

Experiment of phenoloxidase (PO) test was designed as the same as those of SOD, U_L and U_a test except that, for the stocking density of 16 pieces / tank, only two consecutive samples were taken because of insufficient number of shrimps. Shrimp samples with a body length of 6—8cm were collected from October 1, 1995.

Blood samples were collected from the hearts of 4—5 shrimps to measure PO activities for *P. vannamei*. Two consecutive blood samples (each sample consisted of controlled and test groups) were collected in an 20 day's interval and the blood serum was prepared at 4°C to measure their PO activities using a Spectrometer-751. Muscle samples were taken from 2—5 shrimps in 10 day's intervals to measure SOD activity, U_L activity to *Micrococcus lysolei* and U_a activity to *Escherichia coli* of *P. vannamei*. Three consecutive muscle samples (each consisted of controlled and test groups) were collected and the supernatant of muscle homogenate was prepared by centrifugation at 4°C to measure their PO, U_L and U_a activities using the Spectrometer-751.

The results show that PO, SOD, U_L and most U_a activities of *P.vannamei* of the test groups are generally higher than those of the controlled groups, indicating the effectiveness of IPS in enhancing PO, U_L , U_a and SOD activities of *P.vannamei*, leading to an increase in the immunological and anti-oxidation activities (Tab.1 and Tab.2). Further studies are needed to identify the mechanism of IPS in antidisease effect and the relationships among SOD, PO, U_L and U_a activities.

Key words Immunopolysaccharide *Penaeus vannamei* Phenoloxidase activity Superoxide dismutase activity Bacteriolytic and Antibacterial activities

Subject classification number S945.1

中国科技期刊地球科学类排行表^①

(按被引频次和影响因子排序)

| 名次 | 期刊名称 | 被引频次 | 名次 | 期刊名称 | 影响因子 |
|----|--------|------|----|--------|--------|
| 1 | 地球物理学报 | 483 | 1 | 岩石学报 | 0.7471 |
| 2 | 海洋与湖沼 | 317 | 2 | 地质学报 | 0.6061 |
| 3 | 海洋学报 | 317 | 3 | 地球物理学报 | 0.4774 |
| 4 | 地质学报 | 313 | 4 | 地质科学 | 0.4105 |
| 5 | 地质论评 | 292 | 5 | 气象学报 | 0.4052 |
| 6 | 地理学报 | 286 | 6 | 地震学报 | 0.3451 |
| 7 | 大气科学 | 278 | 7 | 地理学报 | 0.3431 |
| 8 | 地质科学 | 271 | 8 | 冰川冻土 | 0.3130 |
| 9 | 地球科学 | 265 | 9 | 地球化学 | 0.3000 |
| 10 | 气象学报 | 261 | 10 | 海洋与湖沼 | 0.2994 |

^① 中国科学引文数据库