

南极超微细菌 ANT52(*Alteromonas stellipolaris*)外膜蛋白和脂多糖的提取物对黑鲷的免疫活性研究*

王海丽^{1,2} 杨季芳^{1,2}

(1. 宁波市微生物与环境工程重点实验室 宁波 315100; 2. 浙江万里学院生物与环境学院 宁波 315100)

提要 从南极超微细菌 ANT52(*Alteromonas stellipolaris*)提取粗外膜蛋白(Outer membrane protein, OMP)和粗脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS), 分不同处理(OMP、LPS、OMP+LPS)免疫注射黑鲷, 在免疫后的第 1、7、14、21、28、35 天时检测试验鱼的白细胞吞噬活性、溶菌酶活力、抗菌活力以及酚氧化酶活力等非特异性免疫指标的变化。结果表明, 自南极超微细菌 ANT52 提取的 LPS 及 OMP 均能够显著提高黑鲷的白细胞吞噬活性($P < 0.05$), 增强黑鲷血清中的抗菌活力、溶菌酶的活力和酚氧化酶活力($P < 0.05$)。各免疫处理对黑鲷免疫活性的影响效果不同, LPS、OMP 单独注射的免疫促进效果优于组合注射 (LPS+OMP); 且 LPS、OMP 单独注射的黑鲷各免疫指标基本上在接种后的第 28 天时最高, 而组合注射 LPS+OMP 在接种后的第 21 天最高。上述物质表现的免疫作用机理有待于进一步研究。

关键词 ANT52 (*Alteromonas stellipolaris*), 外膜蛋白, 脂多糖, 黑鲷, 免疫活性

中图分类号 S942.1

对水产鱼类施用疫苗或免疫增强剂增强鱼体的免疫机能、增强抗病力, 是水产鱼类健康养殖的重要途径。微生物菌体及活性代谢产物是鱼用免疫增强剂的重要来源(钱云霞等, 2000; 郭文婷等, 2006)。南极海洋细菌对酷寒、强辐射和寡营养等南极海洋环境的长期适应, 发展了独特的代谢方式和防御体系, 可以产生在陆地微生物中罕见的活性物质和先导化合物, 如抗冻物质、多不饱和脂肪酸、抗紫外辐射物质、抗菌物质、抗肿瘤物质及多种酶等, 这些物质为免疫增强剂的研究、开发提供了广阔的前景(张波涛等, 2004; 李江等, 2006; Okutani *et al*, 1993)。目前对南极细菌及其产物的抗菌和免疫调节活性已经有了部分研究(张波涛等, 2004; 李江等, 2006; Okutani *et al*, 1993), 但未见其作为水产鱼类免疫增强剂方面的报道。

本文作者以南极海洋超微寡营养细菌 ANT52 (*Alteromonas stellipolaris*)为供试菌株, 提取其脂多糖

(Lipopolysaccharide, LPS)和外膜蛋白(Outer membrane protein, OMP), 研究其对鱼类非特异性免疫功能的影响。有关细菌 LPS、OMP 促进水产动物非特异性免疫功能的研究已有较多报道(Solem *et al*, 1995; 陈昌福等, 2002; Kozinska *et al*, 2004; 闫茂仓, 2005¹⁾; 张明等, 2004; Honda, 1989; 简纪常等, 2004), 但目前的研究多数针对致病菌开展。本文是有关极地超微细菌对水产鱼类免疫活性的首次报道。

1 材料与方法

1.1 免疫原的制备

1.1.1 南极超微细菌 ANT52 的培养 南极超微细菌 ANT52 由 Dr. Tjhing Lok Tan 赠送(Stefanie *et al*, 2004)。采用 ASW 固体培养基于 10⁵ 培养(Tan *et al*, 1999; Stefanie *et al*, 2004), 培养 9 天后收集菌体用于外膜蛋白及脂多糖的制备。

* 国家科技部国际合作重点资助项目, 2007DFA21300 号; 中德政府海洋科学双边合作项目, BMBF CHN 00/019 号; 宁波市科技局资助项目, 2004C100056 号。王海丽, 讲师, E-mail: whlwf2003@yahoo.com.cn

通讯作者: 杨季芳, 研究员, E-mail: jfkwq@163.com

收稿日期: 2007-11-23, 收修改稿日期: 2008-01-15

1.1.2 南极超微细菌 ANT52 外膜蛋白(OMP)的制备

南极超微细菌 ANT52 外膜蛋白(OMP)的制备参照 Dilip 等(1992)和 Filip 等(1973)的用 Sarkosyl 提取 OMP 的方法。OMP 含量的测定采用紫外分光光度法进行(闫茂仓, 2005¹⁾), 并用灭菌生理盐水调节浓度至 250 μg/ml 备用。

1.1.3 南极超微细菌 ANT52 脂多糖(LPS)的制备

南极超微细菌 ANT52 脂多糖的制备参照 Westphal 等(1969)的酚水法。总糖含量的测定采用苯酚-硫酸法(闫茂仓, 2005¹⁾)进行, 并用灭菌生理盐水调节浓度至 250 μg/ml 备用。

1.2 免疫试验设计

1.2.1 供试鱼及饲养条件 选择外观健壮、游动活泼、无外伤的黑鲟(*Acanthopagrus schlegeli*)作为试验鱼, 为 1⁺鱼, 体重(30 ± 5)g, 购自宁波市象山港养殖网箱。试验黑鲟暂养于 2.5m × 2m × 1m 的室内水泥池中, 采用加热棒加温, 充气。暂养一周后, 供试鱼适应环境, 进行免疫接种。试验期间水温为 15 左右。

1.2.2 免疫与采血 供试黑鲟分为 4 个处理, 每个处理 30 尾, 以腹腔注射的方法分别接种不同的免疫原: 对照组 CK 接种 0.7% 的生理盐水; OMP 组、LPS 组分别接种相应抗原溶液, OMP + LPS 组接种 OMP 和 LPS 的混合溶液, OMP : LPS 体积比为 1 : 0.2。每尾鱼接种 0.2ml。分别在免疫接种后的第 1、7、14、21、28、35 天, 各试验组随机抽取 5 尾鱼进行尾静脉采血。所采血液样品分为两份: 一份用 0.5% 肝素钠抗凝后获得血细胞, 用于非特异性免疫指标——白细胞吞噬活性的测定; 另一份按常规法收集血清, 用于酚氧化酶活力、溶菌酶活力及抗菌活力等非特异性免疫指标的测定。

1.3 非特异性免疫指标测定

1.3.1 白细胞吞噬活性 以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 杭州微生物菌种保藏中心)为吞噬菌体, 参考 Siwicki 等(1994)的方法测定供试黑

鲟血液的白细胞吞噬活性, 按以下公式计算吞噬百分比(Phagocytic percentage, *PP*)和吞噬指数(Phagocytic index, *PI*):

$$PP = (100 \text{ 个白细胞中参与吞噬的细胞数}/100) \times 100;$$

$$PI = 100 \text{ 个白细胞内吞噬菌体的总数}/100。$$

1.3.2 酚氧化酶活力的测定 以 3,4-二羟基苯丙氨酸(L-dopa, Sigma)为底物, 参照 Ashida(1971)的方法测定供试黑鲟血清的酚氧化酶活力。

1.3.3 抗菌活力 以大肠杆菌(*Escherichia coli*, 杭州微生物菌种保藏中心)为底物, 参照 Boman(1974)及 Hultmark 等(1980)方法测定供试黑鲟血清的抗菌活力。按以下公式计算抗菌活力(*U_a*): 抗菌活力 $U_a = [(A_0 - A)/A]^{1/2}$ 。

1.3.4 溶菌酶活力 以溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*)干粉(Sigma)为底物, 参照 Hultmark 等(1980)方法测定供试黑鲟血清的溶菌酶活力。按以下公式计算溶菌酶活力(*U_L*): 溶菌酶活力 $U_L = (A_0 - A)/A$ 。

1.4 数据处理

数据结果采用 DPS 数据分析软件 v8.01(唐启义等, 2002)分析。

2 结果与分析

2.1 南极超微细菌 ANT52 外膜蛋白和脂多糖对黑鲟白细胞吞噬活性的影响

不同免疫时间测定各免疫处理黑鲟的白细胞吞噬活性, 其数据处理结果如表 1、表 2 所示。

由表 1、表 2 及数据统计结果分析可知: OMP 组、LPS 组及 OMP+LPS 组的黑鲟白细胞吞噬活性均显著高于对照组(CK) ($P < 0.05$), 说明南极超微细菌 ANT52 的 LPS、OMP 单独注射黑鲟及 OMP+LPS 组合注射黑鲟均可显著提高黑鲟的白细胞吞噬活性 ($P < 0.05$)。且各免疫处理组的黑鲟的白细胞吞噬活性

表 1 不同免疫时间各处理的黑鲟白细胞吞噬百分比(%)比较

Tab.1 Comparison in phagocytic percentage (%) in leucocytes after *A. schlegeli* immunized with different antigens

处理组	免疫时间(d)					
	1	7	14	21	28	35
对照组(CK)	10.33 ± 0.881	11.78 ± 0.838	13.22 ± 0.674	12.91 ± 2.453	14.69 ± 3.782	9.34 ± 2.243
OMP 注射组	12.00 ± 0.577	16.11 ± 1.419	21.57 ± 2.744	25.58 ± 0.488	37.85 ± 2.160*	24.06 ± 2.831
LPS 注射组	15.47 ± 0.744	21.09 ± 1.471	23.59 ± 5.850	30.87 ± 0.718	43.18 ± 3.223*	25.13 ± 3.094
OMP+LPS 注射组	11.00 ± 1.000	18.15 ± 1.030	20.00 ± 3.071	27.13 ± 2.574	16.73 ± 2.327	16.85 ± 1.438

注: 采用邓肯新复极差方法即 SSR 方法进行多重比较, *表示 0.05 差异显著水平。以下各表同

1) 闫茂仓, 2005. 哈氏弧菌外膜蛋白和脂多糖的研究. 华中农业大学硕士学位论文

表 2 不同免疫时间各处理的黑鲟白细胞吞噬指数比较
Tab.2 Comparison in phagocytic index in leucocytes after *A. schlegeli* immunized with different antigens

处理组	免疫时间(d)					
	1	7	14	21	28	35
对照组(CK)	0.213 ± 0.024	0.250 ± 0.024	0.299 ± 0.041	0.234 ± 0.0128	0.385 ± 0.126	0.273 ± 0.155
OMP 注射组	0.257 ± 0.010	0.314 ± 0.014	0.586 ± 0.031	0.551 ± 0.062	0.994 ± 0.175	0.385 ± 0.007
LPS 注射组	0.30105 ± 0.002	0.466 ± 0.021	0.784 ± 0.035	0.730 ± 0.006	1.087 ± 0.066*	0.455 ± 0.026
OMP+LPS 注射组	0.2366 ± 0.0375	0.3421 ± 0.008	0.6353 ± 0.023	0.858 ± 0.008	0.687 ± 0.048	0.378 ± 0.010

差异显著($P < 0.05$), 4 个处理的黑鲟的白细胞吞噬百分比(PP)差异顺序为:LPS 组 > OMP 组 > OMP+LPS 组 > CK; 4 个处理的黑鲟的白细胞吞噬指数(PI)差异顺序为:LPS 组 > OMP 组 > OMP+LPS 组 > CK。且对黑鲟注射免疫原及生理盐水后, 不同时间的黑鲟白细胞吞噬活性差异显著($P < 0.05$)。

单独注射南极超微细菌 ANT52 的 LPS、OMP 后, 黑鲟 PP 、 PI 值呈现先上升后下降的趋势, 在接种后

的第 28 天达到最高; 而混合注射 OMP+LPS 的黑鲟 PP 、 PI 在接种后的 21 天达到最高; 且以单独注射 LPS、OMP 的黑鲟在接种后的第 28 天时 PP 、 PI 值最高, 显著高于其他处理($P < 0.05$)。

2.2 南极超微细菌 ANT52 外膜蛋白及脂多糖对黑鲟血清酚氧化酶活力的影响

不同免疫时间测定各免疫处理的黑鲟血清的酚氧化酶活力, 其数据处理结果如表 3 所示。

表 3 不同免疫时间各处理的黑鲟血清酚氧化酶活力比较
Tab.3 Comparison of the PO activity in serum after *A. schlegeli* immunized with different antigens

处理组	免疫时间(d)					
	1	7	14	21	28	35
对照组(CK)	0.141 ± 0.000	1.297 ± 0.006	1.451 ± 0.000	1.554 ± 0.037	1.498 ± 0.082	1.367 ± 0.017
OMP 注射组	0.176 ± 0.075	1.644 ± 0.004	2.327 ± 0.054	7.194 ± 0.065*	7.884 ± 0.009*	7.900 ± 0.001*
LPS 注射组	0.514 ± 0.008	1.371 ± 0.005	1.496 ± 0.015	7.880 ± 0.015*	7.994 ± 0.004*	3.881 ± 0.079
OMP+LPS 注射组	0.260 ± 0.009	1.731 ± 0.015	0.887 ± 0.012	7.796 ± 0.012*	7.027 ± 0.027*	4.462 ± 0.068

由表 3 及数据统计结果分析可知: OMP 组、LPS 组及 OMP+LPS 组的黑鲟血清酚氧化酶(PO)活力均显著高于对照组 CK, 且各处理黑鲟血清 PO 活力差异显著($P < 0.05$)。3 种免疫原注射的黑鲟血清 PO 活力差异显著顺序为: OMP 组 > LPS 组 > OMP+LPS 组 > CK, 说明单独注射及组合注射南极超微细菌 ANT52 的 LPS 及 OMP 均可提高黑鲟血清 PO 活力。且对黑鲟注射免疫原及生理盐水后, 不同时间的黑鲟血清 PO

活力差异显著($P < 0.05$), 注射后的第 28、21 天黑鲟血清 PO 活力显著高于其他免疫时间, 说明对黑鲟注射南极超微细菌 ANT52 的 OMP、LPS 等免疫原后, 在 28、21 天时提高黑鲟血清 PO 活力效果最好。

2.3 南极超微细菌 ANT52 外膜蛋白及脂多糖对黑鲟血清抗菌活力的影响

不同免疫时间测定黑鲟血清中抗菌活力, 其数据处理结果如表 4 所示。

表 4 不同免疫时间各处理的黑鲟血清抗菌活力比较
Tab.4 Comparison of the antibacteria activity in serum after *A. schlegeli* immunized with different antigens

处理组	免疫时间(d)					
	1	7	14	21	28	35
对照组(CK)	0.0299 ± 0.029	0.0451 ± 0.025	0.074 ± 0.039	0.0806 ± 0.044	0.1069 ± 0.017	0.0583 ± 0.012
OMP 注射组	0.0556 ± 0.030	0.0905 ± 0.028	0.1221 ± 0.009	0.1085 ± 0.031	0.2108 ± 0.013	0.1085 ± 0.011
LPS 注射组	0.0429 ± 0.025	0.1489 ± 0.035	0.2209 ± 0.089	0.197 ± 0.015	0.2459 ± 0.00	0.1315 ± 0.041
OMP+LPS 注射组	0.0694 ± 0.034	0.0719 ± 0.037	0.1215 ± 0.009	0.147 ± 0.049	0.1259 ± 0.014	0.0719 ± 0.013

由表 4 及数据统计结果分析可知:OMP 组、LPS 组及 OMP+LPS 组的黑鲟血清抗菌活力均高于对照组 CK, 且各处理差异显著($P<0.05$), 说明对黑鲟注射南极超微细菌 ANT52 的 OMP、LPS 可显著提高其血清的抗菌活力。3 种免疫原提高黑鲟血清抗菌活力的顺序为:LPS 组>OMP+LPS 组>OMP 组>CK。且对黑鲟注射免疫原及生理盐水后, 不同时间的黑鲟血清抗

菌活力差异不显著($P>0.05$)。但基本上以注射后的第 1、28 天较高。且以 LPS 注射后的第 1、28 天的黑鲟血清抗菌活力最高。

2.4 南极超微细菌 ANT52 外膜蛋白及脂多糖对黑鲟血清溶菌酶活力的影响

在不同免疫时间测定黑鲟血清中溶菌酶活力, 其数据处理结果如表 5 所示。

表 5 不同免疫时间各处理的黑鲟血清溶菌酶活力比较
Tab.5 Comparison of the lysozyme activity in serum after *A. schlegeli* immunized with different antigens

处理组	免疫时间(d)					
	1	7	14	21	28	35
对照组(CK)	0.2517 ± 0.089	0.1959 ± 0.033	0.2034 ± 0.085	0.2265 ± 0.049	0.1956 ± 0.077	0.1638 ± 0.060
OMP 注射组	0.3374 ± 0.041	0.2222 ± 0.007	0.2519 ± 0.042	0.2836 ± 0.065	0.386 ± 0.066	0.2225 ± 0.082
LPS 注射组	0.405 ± 0.073	0.2612 ± 0.037	0.3518 ± 0.035	0.34 ± 0.096	0.4266 ± 0.089*	0.3476 ± 0.062
OMP+LPS 注射组	0.3152 ± 0.037	0.2507 ± 0.014	0.2848 ± 0.037	0.3605 ± 0.027	0.2841 ± 0.146	0.3044 ± 0.058

由表 5 及数据统计结果分析可知:OMP 组、LPS 组及 OMP+LPS 组的黑鲟血清溶菌酶活力均显著高于对照组 CK, 且各处理组黑鲟血清溶菌酶活力差异显著 ($P<0.05$)。LPS 注射组的黑鲟血清溶菌酶活力均显著高于对照组 CK, 说明南极超微细菌 LPS 注射黑鲟可显著提高黑鲟的血清的溶菌酶活力($P<0.05$)。而 OMP 注射组、OMP+LPS 注射组黑鲟血清溶菌酶活力尽管高于 CK, 但未达到差异显著的水平($P>0.05$)。

对黑鲟注射免疫原及生理盐水后, 不同时间的黑鲟血清溶菌酶活力差异显著($P<0.05$), 且注射免疫原的黑鲟血清溶菌酶活力高于对照组 CK, 说明对黑鲟注射南极超微细菌 ANT52 的 OMP、LPS 可不同程度地提高黑鲟血清的溶菌酶活力。免疫原注射 28d 后黑鲟的血清溶菌酶活力最高。

另外, 以单独注射 LPS 的黑鲟在免疫第 28 天后的血清溶菌酶活力最高, 显著高于其他; 单独注射 OMP 的黑鲟血清溶菌酶活力在接种后第 28 天最高, 而 OMP+LPS 注射的黑鲟在免疫后的第 21 天时的血清溶菌酶活力最高, 显著高于其他免疫时间。综合以上, 以单独注射 LPS 的黑鲟在接种后第 28 天时的血清溶菌酶活力最高。

3 讨论

鱼类作为较低等脊椎动物, 相对于哺乳动物而

言, 其更大程度上依赖非特异性免疫系统来抵御疾病的侵袭。参与鱼类非特异性免疫作用的主要因子包括吞噬细胞、溶菌酶等(肖克宇, 2007; 钱云霞等, 2000)。在鱼类血液中, 白细胞(包括单核细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等)具有吞噬异物的能力, 它们的数量和吞噬能力的高低(即吞噬活性)可直接反映出鱼类非特异性免疫功能的强弱(肖克宇, 2007)。在鱼类的粘液、血清和某些淋巴组织中, 还广泛分布着溶菌酶, 它能水解革兰氏阳性细菌的细胞壁, 破坏和消除侵入体内的异物; 溶菌酶活力的提升, 可增强溶菌酶溶解细菌的能力。同时, 溶菌酶的活性也是决定吞噬细胞对所吞噬的致病菌能否被杀灭的物质基础之一(郭文婷等, 2006; 梁小威, 1993; Paige *et al*, 2000)。溶菌活力和抗菌活力是细胞和体液免疫的综合体现, 反映了机体对外源微生物侵袭的防御能力, 可以作为衡量免疫功能及机体状态的指标(高冬梅, 2003¹⁾)。在鱼类的血液中还存在着酚氧化酶(PO), 其一般以无活性的酶原形式——酚氧化酶原(pro-PO)存在, 革兰氏阴性细菌的 LPS 通过天然的丝氨酸蛋白酶诱导的有限蛋白水解能激活 pro-PO, 发生复杂的酶级联反应产生黑色素, 能够介导血细胞以类补体的方式参与防御反应。pro-PO 激活系统可能是免疫识别过程的重要组成部分(李国荣, 2000²⁾)。本研究以白细胞吞噬活性、溶菌酶活力、抗菌活力及酚氧化酶活力等 4 个

1) 高冬梅, 2003. 鳃弧菌疫苗对牙鲆和鲈鱼免疫效果研究. 中国海洋大学硕士学位论文

2) 李国荣, 2000. 青岛文昌鱼酚氧化酶的定位、功能及其在胚胎发育中的变化. 中国科学院博士学位论文

指标的变化来综合反映南极超微细菌 ANT52 粗提 LPS 和 OMP 对黑鲟非特异性免疫功能的影响, 是较为全面、可靠的。

目前对南极细菌及其产物的抗菌和免疫调节活性已经有了部分研究。David 最早在 1988 年就从南极土壤中分离出具有溶菌能力、溶琼脂能力的嗜冷型粘细菌(David, 1988)。Hellio 等(2000)从南极海域 16 种海洋微藻中提取出具有抗菌活性的物质, 其中 9 种提取物可以强烈抑制海洋真菌和革兰氏阳性菌, 而且经过试验证明, 这些提取物对牡蛎和海胆的幼体几乎没有毒性。李江等(2006)报道了南极细菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 的胞外多糖能够促进小鼠脾淋巴细胞的转化。本研究的结果表明, 自南极超微细菌 ANT52 提取的 OMP 及 LPS 可显著提高黑鲟血液中白细胞吞噬活性、溶菌酶活力、抗菌活力和酚氧化酶活力, 指示了南极超微细菌 ANT52 的 OMP 及 LPS 对黑鲟具有较好的免疫活性, 能够显著增强黑鲟的非特异性免疫功能。这种活性也与现有报道中部分致病菌的 LPS(Solem *et al*, 1995; 陈昌福等, 2002; Kozinska *et al*, 2004; 闫茂仓等, 2005¹⁾)可促进水产养殖动物如鲫鱼、石斑鱼、对虾、牙鲆等的非特异性免疫功能相一致。脂多糖是菌体细胞壁的重要结构成分, 由各种多糖多成; 作为一种古老的微生物细胞壁的成分, 鱼类在进化过程中可能已形成一种识别它的机制, 把它作为一种潜在的病原细菌, 从而刺激机体产生免疫应答, 这在一定程度上可解释其增强鱼类非特异性免疫的机制。不过, 本项初步研究尚不能说明南极超微细菌 ANT52 脂多糖和外膜蛋白增强鱼类非特异性免疫功能真正的生物学原理, 有待进一步研究和探索。

本研究中南极超微细菌 ANT52 的粗 LPS、OMP 均可显著提高黑鲟的非特异性免疫功能, 但作用效果稍有不同: 不同免疫原注射黑鲟后, 非特异性免疫指标出现峰值的时间不同, 单独注射 LPS、OMP 28 天后黑鲟血液中 4 个免疫指标均达到峰值, 而组合注射 OMP + LPS 后在第 21 天达到最高; 且 LPS 单独作用效果最好, 次之为单独注射 OMP 及组合注射 OMP + LPS。与本研究结果不同, 有报道认为 LPS 可作为 OMP 的佐剂提高单独使用的效果(黄新新等, 2002); 相反, 也有报道称 LPS 的免疫促进效果优于 OMP,

LPS 才是主要的免疫保护抗原(陈昌福等, 2002; 张晓华等, 1997)。本研究中南极超微细菌 ANT52 在细胞膜结构、外膜蛋白种类等方面存在的特殊性, 与常见致病菌不同, 从而导致了黑鲟免疫活性的差异性。有关 LPS 和 OMP 的免疫保护作用的关系尚存争议, 有待于进一步的研究。

此外, 鱼类非特异性免疫因子(如白细胞吞噬活性、溶菌酶、抗菌活力及 PO 活力等)水平不仅受鱼体遗传机制的影响, 同时也受鱼体的规格及健康状况、养殖季节及环境因子(温度、免疫刺激剂、营养、逆境等)的影响(肖克宇, 2007)。本试验所采用的黑鲟平均体重约 30g, 试验时间为 2007 年 1—2 月进行, 此时水温较低, 此环境不适合黑鲟的生长, 黑鲟生理机能偏低, 因此对外界环境的反应能力也降低, 这是导致本研究黑鲟免疫指标测定值低于已有报道的主要原因(Solem *et al*, 1995; 陈昌福等, 2002; Kozinska *et al*, 2004; Honda, 1989; 高冬梅, 2003¹⁾; 刘云等, 2004)。另外, 本试验的供试菌株南极超微细菌 ANT52 生物学特殊性也是造成这种差别的原因之一(Stefanie *et al*, 2004)。

综上所述, 南极超微细菌 ANT52 的 LPS 及 OMP 可显著提高黑鲟的非特异性免疫功能, 有利于其广谱性地抵抗外来病原及异物的侵袭, 提高了免疫力, 其作为免疫增强剂可单独与其他疫苗组合应用于鱼类疾病的预防, 具有较广阔的前景。

参 考 文 献

- 刘云, 孙峰, 王丹, 2004. 免疫增强剂对鲫鱼非特异性免疫功能的影响. 海洋环境科学, 28(9): 42—45
- 李江, 陈靠山, 李莹玉等, 2006. 南极细菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 的分子鉴定及其胞外多糖促进小鼠脾淋巴细胞转化的作用. 中国海洋药物, 25(1): 1—5
- 肖克宇, 2007. 水产动物免疫与应用(第一版). 北京: 科学出版社, 89—101
- 张明, 王雷, 郭振宇等, 2004. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响. 海洋环境科学, 28(7): 22—25
- 张波涛, 缪锦来, 李光友等, 2004. 南极微生物活性物质研究进展. 海洋环境科学, 28(2): 58—63
- 张晓华, 徐怀恕, 1997. 副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性研究. 中国水产科学, 4(4): 49—53
- 陈昌福, 陈超然, 2002. 鱼类三种致病菌的粗脂多糖对异育银

1) 闫茂仓, 2005. 哈氏弧菌外膜蛋白和脂多糖的研究. 华中农业大学硕士学位论文

- 鲫的免疫原性. 水生生物学报, 26(5): 483—488
- 钱云霞, 王国良, 邵建忠, 2000. 鱼类的非特异性免疫调节. 宁波大学学报(理工版), 13(1): 95—99
- 郭文婷, 李健, 王群等, 2006. 微生态制剂对牙鲆非特异性免疫因子影响的研究. 海洋科学进展, 24(1): 51—58
- 唐启义, 冯明光, 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社, 59—62
- 黄新新, 陆承平, 2002. 迟缓爱德华菌全菌及外膜蛋白的免疫力比较. 中国免疫学杂志, 18(3): 187—189
- 梁小威, 1993. 几种淡水鱼类血清溶菌酶初步观察. 水产科学, 12(2): 15—17
- 简纪常, 叶剑敏, 吴灶和, 2004. 溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响. 水生生物学报, 28(1): 103—105
- Ashida M, 1971. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Arch Biochem Biophys, 144: 749—762
- Boman H G, 1974. Insect immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction to hemolymph of *Samca cynchiapupae*. Insect Immune, 10: 136—145
- David W, 1988. Psychrophilic myxobacteria from Antarctic soil. Polarforschung, 58(2/3): 271—278
- Dilip K S, Tapas K S, Asoke C G, 1992. Major outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* and the role in induction of protective immunity through inhibition of intestinal colonization. Infect Immun, 60(11): 48—48
- Filip C, Fletcher G, Wulff J L *et al*, 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. J Bacteriol, 115: 717—772
- Hellio C, Bremer G, Pons A M *et al*, 2000. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. Appl Microbiol Biotechnol, 54: 543—549
- Honda Akihiko, 1989. Immune response of rainbow trouts immunized with formalin-killed *Vibrio anguillarum*: activity of phagocytosis of fish macrophages and opsonizing effect of antibody. Japanese Journal of Veterinary Medicine, 32(20): 94
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T *et al*, 1980. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem, 106: 7—16
- Kozinska A, Guz L, 2004. The effect of various *Aeromonas bes-tiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish Shellfish Immunol, 16: 437—445
- Okutani K, Shigeta S, 1993. Inhibitory effect of sulfated derivatives of a marine bacterium polysaccharide on replication of human immune-deficiency virus *in vitro*. Nippon Suisan Gakkaishi, 59(8): 1433—1435
- Paige A Ackerman, George K Iwama, Julian C Thornton, 2000. Physiological and immunological effects of adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout. Journal of Aquatic Animal Health, 12: 157—164
- Siwicki A K, Anderson D P, Rumsey G L, 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protects against furunculosis. Vet Immunol Immunopathol, 41: 125—139
- Solem S T, Jorgensen J B, Borre R, 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. Fish Shellfish Immun, 5(7): 475—491
- Stefanie Van Trappen, Tjhing-Lok Tan, Jifang Yang *et al*, 2004. *Alteromonas stellipolaris* sp. nov., a novel, budding, prosthecate bacterium from Antarctic seas, and emended description of the genus *Alteromonas*. Int J Syst Evol Microbiol, 54: 1157—1163
- Tan T L, Joiris C R, Glansdorff N *et al*, 1999. Dominance of oligotrophic bacteria in surface waters above Gunnerus and Astrid Ridge, Antarctic Ocean. Arch Hydrobiol Spec, Issues Advanc Limnol, 54: 237—253
- Westphal O, Jann K, 1969. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods Car Chemistry, 5: 83—96

THE IMMUNITY OF *ACANTHOPAGRUS SCHLEGELI* INJECTED WITH OUTER MEMBRANE PROTEIN AND LIPPOLYSACCHRIDE OF ANTARCTIC ULTRAMICROBACTERIA ANT52 (*ALTEROMONAS STELLIPOLARIS*)

WANG Hai-Li^{1,2}, YANG Ji-Fang^{1,2}

(1. Municipal Key Laboratory of Microorganism and Environmental Engineering of Ningbo City, Ningbo, 315100; 2. Faculty of Biological & Environmental Science of Zhejiang Wanli University, Ningbo, 315100)

Abstract The immunity competence of *Acanthopagrus schlegeli* was studied by injecting with crude outer membrane protein (OMP) and lipopolysacchride (LPS) extracted from Antarctic ultramicrobacteria ANT52 (*Alteromonas stellipolaris*) in different combinations. Four parameters: the phagocytic activity of leucocytes in blood, and the activities of lysozyme, antibacteria, and phenoloxidase in serum of immunized fish, being used to represent the non-specific immunogenicity, were determined in 1, 7, 14, 21, 28, and 35 days after the injection. The results showed that the four parameters rose significantly during the experimental period ($P < 0.05$). These parameters of single OMP or LPS treatment group were greater than those injected with OMP+LPS combination treatment group; and reached peak value in 28 days post vaccination. It indicates that immunization with OMP and LPS of ANT52 could stimulate and enhance the function of non-specific immunity of *A. schlegeli*. Future studies are needed to understand the mechanism of the immunity competence.

Key words ANT52 (*Alteromonas stellipolaris*), Outer membrane protein, Lipopolysaccharide, *Acanthopagrus schlegeli*, Immunity competence