

重组酵母菌对牙鲆非特异性 免疫能力的影响*

王宏田 张培军

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071)

提要 于 1999 年 10—11 月间在荣成市寻山养殖场实验了饲喂含有大麻哈鱼生长激素基因的重组酵母对 1 龄牙鲆非特异性免疫能力的影响。实验分为对照组和 3 个实验组。对照组的饵料中不含重组酵母菌, 实验组的饵料中分别含有重组酵母菌 0.25%、0.50%、0.75% (W/W)。实验表明, 通过投喂重组酵母菌, 可以增加牙鲆血清蛋白的含量, 增强牙鲆血清中溶菌酶及抗蛋白酶物质的活性, 这种影响与重组酵母菌的含量成正相关。

关键词 牙鲆 重组酵母菌 非特异性免疫

学科分类号 Q45

越来越多的实验表明, 通过使用免疫增强剂(Immunostimulants)可以有效地增强鱼类抵抗外界病原体侵袭的能力, 同时也可以减轻外界环境胁迫对鱼类的免疫抑制作用(Anderson, 1992)。已有研究表明, 由酵母菌中提取的葡聚糖在大西洋鲑(*Salmo salar* L.)和虹鳟(*Salmo gairdneri* R.)中可有效地提高其抗病能力(Robertson *et al.*, 1990; Jeney *et al.*, 1997); 外源生长激素同样有利于增强鱼类的抗病能力(Kajita *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1996a, b, c, 1997)。饲喂含有生长激素的重组酵母菌对于增强鱼类免疫能力的效果, 是一个值得探讨的问题。本实验以牙鲆为实验对象, 考察含有大麻哈鱼生长激素基因的重组酵母菌对其某些非特异性免疫能力的影响。

1 材料与方法

1.1 重组酵母菌

含有大麻哈鱼生长激素基因的重组酵母菌由中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室培养。使用前将重组酵母菌培养液真空干燥, 于 -20°C 低温保存。

1.2 鱼的饲养

实验组和对照组的 1 龄牙鲆分别在 4 个培养池中饲喂。每个培养池的容水量约为 40m^3 , 饲养实验备用鱼 2500 条左右, 进行通气、流水饲养。上午、下午投饵各一次。每一饲养池每天的投饵量约 20kg, 连续投喂 30d。对照组的饵料不含重组酵母菌, 实验组 I、实验组 II、实验组 III 的饵料中分别含有重组酵母菌 0.25%、0.50%、0.75% (W/W)。

* 国家“973”课题资助项目, G1999012003 号。王宏田, 男, 出生于 1970 年 3 月, 博士, E-mail: hughw@sohu.com

收稿日期: 1999-12-24, 收修稿日期: 2000-04-01

1.3 血清的采集与分析

从对照组和实验组的备用鱼中分别取 15 条鱼, 各组鱼的平均体重分别为 270g 左右。断尾取血, 于 4℃ 冰箱中放置 24h, 使血液凝结, 分离出血清。收集上层血清, 于 -30℃ 保存待测。

1.4 溶菌酶活力的测定

参考有关文献(陈昌福等, 1996), 并作适当的修改, 具体方法如下: 将溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*, Sigma 产品) 用 0.01mol/L 磷酸缓冲液(PBS) (pH= 6.2) 稀释至波长为 530nm 时吸光度为 0.8 的菌悬液。将 1ml 该菌悬液与 0.1ml 血清混合, 测定反应开始时混合液于 470nm 的吸光度 A , 然后将混合液于 37℃ 保温 60min, 冰浴冷却使反应停止, 于 470nm 处测其吸光度 A , 以每 mg 血清蛋白每分钟使混合液吸光度降低的数值, 来表示溶菌酶的活力 [unit/(min·mg)], 具体计算公式为: $E = (A - A_0)/60m$, m 代表血清蛋白的质量 (mg), 60 代表反应的时间 (min)。进行吸光度测量时, 以 PBS 作空白对照。

1.5 抗蛋白酶物质活力的测定

抗蛋白酶活力通过血清中的抗蛋白酶物质抑制胰蛋白酶水解酪蛋白的能力来表示 (Marsdan *et al*, 1996)。蛋白酶的活力以一定时间内, 一定质量的蛋白酶水解酪蛋白的量表示(周慧等, 1994)。具体操作如下: 将酪蛋白溶解于 0.025mol/L (pH= 7.5) 的磷酸缓冲液(PBS) 中, 制成 2% 的蛋白溶液, 将 0.8ml 酪蛋白溶液与 0.1ml PBS 混合, 于 37℃ 保温 10min, 加入 0.1ml 胰蛋白酶溶液 (36.25U/ml), 于 37℃ 保温 30min, 加热使酶失活, 然后加入 2ml 考马斯亮蓝溶液, 20min 后于 595nm 测定吸光值。对照样品中, 将 0.8ml 的酪蛋白溶液与 0.1ml 的 PBS、0.1ml 胰蛋白酶溶液混合后, 不经保温, 直接加热使酶失活, 然后加入 2ml 考马斯亮蓝溶液, 测定吸光度。记录吸光度的差值 ΔA_1 。测定血清抗蛋白酶的活性时, 将待测血清用磷酸缓冲液稀释 10 倍, 然后将 0.8ml 酪蛋白溶液与 0.1ml 稀释后的血清以及 0.1ml 胰蛋白酶溶液混合, 依上述方法测定吸光度的差值 ΔA_2 。以每 mg 血清蛋白每分钟使胰蛋白酶活力降低的数值, 表示抗蛋白酶物质的活力 [unit/(min·mg)], 计算公式为: $E = (\Delta A_1 - \Delta A_2)/30m$, 其中 m 代表血清蛋白的含量 (mg), 30 代表反应时间 (min)。进行吸光度测定时, 用 PBS 作空白对照。

1.6 血清蛋白含量的测定

以牛血清蛋白作标准蛋白, 用 Coomassie 亮蓝染色法测定血清蛋白的含量(徐宜为, 1979)。

2 结果与讨论

从表 1 中可以看出, 向牙鲈投喂重组酵母菌, 可以提高牙鲈血清中蛋白质的含量, 同时可以提高牙鲈血清中溶菌酶和抗蛋白酶物质的活性。随着饵料中重组酵母菌的含量增高, 这种影响效果也更加显著 ($p < 0.05$)。

酵母胞壁中提取的葡聚糖作为免疫增强剂在国际上已经实现商品化生产和应用。在大西洋鲑 (*Salmo salar* L.)、虹鳟 (*Salmo gairdneri* R.) 和大菱鲈 (*Scophthalmus maximus* L.) 的研究中发现, 葡聚糖能够增强鱼类体内溶菌酶的活力 (Engstad *et al*, 1992; Thompson *et al*, 1995; Baulny *et al*, 1996)。在另外的实验中发现, 在牙鲈的消化道中可以检测

表 1 重组酵母菌对牙鲆血清中蛋白质含量、溶菌酶活性、抗蛋白酶物质活性的影响($n = 15$)

Tab. 1 The effects of recombinant yeast on the total protein contents, lysozyme activities and antiprotease activities in the serum of *Paralichthys olivaceus* ($n = 15$)

项 目	对照组	实验组 I	实验组 II	实验组 III
血清蛋白含量(mg/ml)	18.9 ± 2.8	20.9 ± 3.7	23.6 ± 3.1	25.6 ± 2.9
溶菌酶活性 unit/(min·mg)	2.93 ± 0.79	3.78 ± 0.93	4.67 ± 1.24	5.38 ± 1.31
抗蛋白酶物质的活性 [× 10 ⁻² unit/(min·mg)]	2.72 ± 0.95	3.25 ± 0.76	4.13 ± 1.35	5.07 ± 1.83

出纤维素酶和溶菌酶的活性, 由此看来, 酵母菌的胞壁可以被牙鲆消化道中的酶所降解。牙鲆血清中某些激素的含量随着饵料中重组酵母菌含量的增加而逐渐增多的现象(王宏田等, 2000), 能够间接证明这一推测。当酵母菌的胞壁被牙鲆体内的酶降解从而释放出其中的葡聚糖之后, 葡聚糖作为免疫增强剂, 使牙鲆血清中蛋白质含量增高, 同时增强溶菌酶和抗蛋白酶物质的活力。这可能是重组酵母菌能够增强牙鲆非特异性免疫能力的机制之一。

生长激素对于鱼类非特异性免疫能力的增强作用也为以往的研究所证实。Kajita 等(1992) 和 Sakai 等(1996a、b、c, 1997) 等人在对虹鳟的研究中发现, 外源生长激素能够促进淋巴细胞的有丝分裂, 增强血清溶血能力等。Calduch- Giner 等(1995) 在金头鲷的单核细胞和淋巴细胞中检测出生长激素的受体, 生长激素对鱼类免疫能力的影响可能与这类受体的功能相联系, 这种影响受到神经内分泌系统的调节(Auernhammer *et al.*, 1995)。研究表明, 投喂重组酵母可以有效地提高牙鲆血清中生长激素的含量(王宏田等, 2000)。因此, 重组酵母菌对于牙鲆非特异性免疫能力的增强作用, 与外源生长激素的作用可能有某些相同的机制。这可能是重组酵母菌增强牙鲆非特异性免疫能力的另一种机制。

提高鱼体的免疫能力, 是增强鱼体抵抗病原体侵袭的重要手段。研究表明, 与葡聚糖、生长激素相类似, 其他许多物质也具有提高鱼体免疫能力的功能, 这类物质通称为免疫增强剂。免疫增强剂可能通过作用于神经内分泌系统调节鱼类的免疫能力, 具体的调节途径还需要进一步实验论证。有关这方面的研究, 将有助于更深入地了解免疫增强剂的作用原理。

本实验结果表明, 重组酵母能够提高牙鲆血清中蛋白质的含量, 增强牙鲆血清中溶菌酶和抗蛋白酶物质的活力。重组酵母菌对于牙鲆其他免疫能力的影响, 投喂重组酵母菌是否能够使牙鲆抵抗某些环境病原体的侵染, 以及最适的投喂时间和投喂剂量等, 都将是今后需要研究的问题。

参 考 文 献

- 王宏田, 徐永立, 张培军等, 2000. 重组酵母菌对牙鲆生长及血清中某些激素含量的影响. 海洋与湖沼, 31(2): 135—138
- 陈昌福, 罗宇良, 蔡 冰等, 1996. 饲养水温对草鱼溶菌酶活性的影响. 中国水产科学, 3(3): 25—30
- 周 慧, 鲁治斌, 齐 杰等, 1994. 蛋白水解酶活力测定新方法. 生物化学杂志, 10(5): 630—633
- 徐宜为, 1979. 实验免疫学技术. 北京: 科学出版社, 199

Fish Dis, 2: 281—307

Auernhammer C J, Strasburger C J, 1995. Effects of growth hormone and insuline-like growth factor I on the immune system. Eur J Endocrinol, 133: 635—645

Baulny M O D, Quentel C, Fournier V *et al*, 1996. Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis Aquat Org, 26: 139—147

Calduch-Giner J A, Sitia-Bobadilla A, Alvarez Pellitero P *et al*, 1995. Evidence for a direct action of GH on Haemopoietic cells of a marine fish, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). J Endocrinol, 146: 459—467

Engstad R E, Robertsen B, Frivold E, 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol, 2: 287—297

Jeney G, Galeotti M, Volpatti D *et al*, 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154: 1—15

Kajita Y, Sakai M, Kobayashi M *et al*, 1992. Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. Fish Shellfish Immunol, 2: 155—157

Marsden M J, Freeman L C, Cox D *et al*, 1996. Non-specific immune response in families of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exhibiting differential resistance for furunculosis. Aquaculture, 146: 1—16

Robertson B, Rostadt G, Engstad R *et al*, 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J Fish Dis, 13: 391—400

Sakai M, Kobayashi M, Kawauchi H, 1996a. In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. J Endocrinol, 151: 113—118

Sakai M, Kobayashi M, Kawauchi H, 1996b. Mitogenic effects of growth hormone and prolactin on chum salmon *Oncorhynchus keta* leucocyte in vitro. Vet Immunol Immunopathol, 53: 185—189

Sakai M, Kajita Y, Kobayashi M *et al*, 1996c. Increase in haemolytic activity of serum from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with exogenous growth hormone. Fish Shellfish Immunol, 6: 615—617

Sakai M, Kajita Y, Kobayashi M *et al*, 1997. Immunostimulating effect of growth hormone: in vivo administration of growth hormone in rainbow trout enhances resistance to *Vibrio anguillarum* infection. Vet Immunol Immunopathol, 57: 147—152

Thompson K D, Cachos A, Inglis V, 1995. Immunomodulating Effects of Glucan and Oxytetracycline in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, on Serum Lysozyme and Protection. In: Shariff M, Subasighe R P, Arthur J R ed. Disease in Asian Aquaculture. Vol. 11. Fish Health Section. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, 433—439

EFFECTS OF RECOMBINANT YEAST ON THE NON-SPECIFIC IMMUNE ACTIVITIES OF *PARALICHTHYS OLIVACEUS*

WANG Hong-tian, ZHANG Pei-jun

(*Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology,*

The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Experiments were conducted at Rongcheng Xunshan Fishery to analyze the effects of recombinant yeast on the immune parameters of flounder, *Paralichthys olivaceus*. No recombinant yeast was fed in the control group. In the experimental groups, Group I, Group II, Group III 0.25%, 0.50%, 0.75% (W/W) recombinant yeast was mixed in the diet, respectively, to feed the fish. The results show that, in the control group, group I, group II and group III, the total serum protein contents were 18.9–25.6 mg/ml, respectively; and the lysozyme activities were 2.93–5.38 [unit/(min·mg)]; the antiprotease activities were 2.72–5.07 [$\times 10^{-2}$ unit/(min·mg)], respectively. Hence, when recombinant yeast was mixed with the diet, some non-specific immune parameters of *Paralichthys olivaceus* were enhanced.

Key words *Paralichthys olivaceus* Recombinant yeast Non-specific immune activities

Subject classification number Q45