

灭活鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 刺激后 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血液 抗菌活性的变化*

姚翠鸾^{1,2} 吴长功² 相建海^{2①}

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用对中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 人工注射灭活鳃弧菌, 利用溶壁微球菌 (*Micrococcus luteus*) 和鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 作为测试菌株, 对在抑菌活性检测中最为常用的抑菌圈法、辐射扩散法和液体培养基微量稀释检测法进行了技术改进并比较了它们的检测效果, 并检测了阳离子交换柱层析法初步分离的中国明对虾血淋巴主要组分的抗菌活性, 进行了细菌攻毒前后中国明对虾血浆及血细胞抗菌活性变化的研究。结果表明, 液体培养基微量稀释检测法抑菌效果在三种方法中灵敏度最高, 抑菌圈法灵敏度最低, 但对于蛋白含量较高的样品, 辐射扩散法被证明在抑菌活性检测方面更为适用。利用改进的辐射扩散法对灭活鳃弧菌攻毒前后的中国明对虾血细胞和血浆的抑菌活性进行了检测, 结果显示, 虽然感染后血细胞数目显著降低 ($P < 0.05$), 但其抑菌能力却明显增强 ($P < 0.05$), 相对而言, 血浆抑菌活性变化不显著 ($P > 0.05$), 说明血细胞在受到免疫刺激后抗菌因子的表达进一步加强。

关键词 中国明对虾, 抑菌检测方法, 抑菌活力

中图分类号 S945

对虾的免疫防御体系主要依靠吞噬, 包囊和非特异性免疫因子的作用 (Söderhäll *et al.*, 1992)。其中抗菌因子作为一类非特异性免疫因子可以直接杀灭外来病原, 在免疫抗病反应中起到非常重要的作用。

研究证实, 自然状态或经细菌感染后的对虾血浆和血淋巴中都存在抑菌活性物质 (王雷等, 1995; Chisholm *et al.*, 1995; Destoumieux *et al.*, 1997; 李春猛等, 1999; 雷质文等, 2001; Haug *et al.*, 2002)。Alabi 等 (2000) 报道凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 在注射细菌后血淋巴抑菌能力明显增强。Song 等 (2003) 研究表明人工注射 Taura 综合症病毒 (Taura syndrome virus, TSV) 的凡纳滨对虾血浆抑菌活性变化不明显。实验证明, 注射低浓度的脂多糖 (LPS) 可以提高斑节对虾 (*Penaeus*

monodon) 血淋巴的抗菌活性 (Sritunyalucksana *et al.*, 1999)。此外, 研究证实抗菌因子表达还受到外界环境因素的影响 (Moullac *et al.*, 2000)。

抗菌力是免疫力的一项重要指标, 但目前对虾抗菌活性的检测大多借鉴其他生物的检测方法如抑菌圈法 (Barry, 1980)、辐射扩散法 (Lehrer *et al.*, 1991)、比色法 (Hultmark *et al.*, 1980) 等。由于对虾血淋巴中丰度最大的血蓝蛋白占其总蛋白的 90% 以上 (Rochu *et al.*, 1978; Depledge *et al.*, 1989), 而且血淋巴中总蛋白、多糖含量高, 成分与其他物种有所不同, 抗菌活性也存在差异, 使得这些方法在应用过程中稳定性、重复性都存在缺陷。因此对检测方法加以优化使其更为灵敏、准确、快速, 无疑可以为找到更多的抗菌分子以及更好了解对虾的免疫应答提供一种技术手段。

* 国家自然科学基金资助项目, 36071605 号; 集美大学中青年创新团队专项基金, 2006A001 号。姚翠鸾, 博士, E-mail: yaoc2000@yahoo.com.cn

① 通讯作者: 相建海, 研究员, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2005-10-18, 收修改稿日期: 2006-02-03

传统上人们常采用抑菌圈法,测试了许多的物质抗菌活性(Barry, 1980)。1991年,Lehrer改进了这种方法,成功地减少了样品量并提高了检测的灵敏度。液体培养基微量稀释检测法作为近年来发展起来的一种高通量的检测手段,在抗菌活性的检测中,因其具有加样量少、操作简便、通过酶标仪测量来计算抑菌活性更为客观准确等优点在抗菌活性检测中逐渐得到广泛应用(Steinberg *et al.*, 1997)。

本研究中三种常用的抗菌检测方法加以改进,筛选优化出一套灵敏度较高的适合对虾血浆和血细胞的抑菌活性检测方法,并对中国明对虾在受到细菌刺激前后血浆和血细胞的抑菌能力变化进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)购自青岛水产品市场,体长(8.0 ± 0.6)cm,体重(7.7 ± 0.7)g。

实验用溶壁微球菌(*Micrococcus luteus*)(G⁺)与鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)(G⁻)由中国科学院海洋研究所莫照兰博士惠赠。

1.2 菌悬液的制备与免疫诱导

将培养至对数生长期的细菌,加入甲醛至终浓度0.5%培养12h,900g、4℃离心10min,溶壁微球菌用pH 7.3的PBS洗涤3遍,鳃弧菌用pH 7.2的Tris-NaCl(0.55mol/L NaCl, 0.05mol/L Tris, pH 7.2)缓冲液洗涤3遍,并悬浮于相应的缓冲液中。细菌数目采用血球计数板计数。细菌诱导参照郭振宇等(2001)的方法,分别取注射鳃弧菌0、1.5、3、6、12、24h后的中国明对虾血淋巴,实验组每次取10尾对虾。

1.3 血浆及血细胞裂解液的制备

注射器中预先加入4℃预冷的抗凝剂,血淋巴:抗凝剂(Vargas-Albores *et al.*, 1993)按照1:2的比例,从中国明对虾第一腹节腹血窦抽取血淋巴后800g、4℃离心5min,分别收集血浆和血细胞。血细胞用对虾抗凝剂洗涤3遍,悬浮于少量抗凝剂中,超声波组织匀浆机处理使其裂解,15000g离心30min后,取上清液备用。

1.4 抑菌检测方法的优化

普通抑菌圈法(inhibition zone assay):接种合适浓度的菌悬液,将约10ml培养基倒入直径9cm的培养皿,待其凝固后在培养基上打直径为5mm

的孔,将待测样品加入孔中,每孔加30μl稀释100倍、稀释10倍和未稀释的血浆。溶壁微球菌和鳃弧菌分别在37℃与28℃培养。

辐射扩散法(radical diffusion assay):参考Lehrer等(1991)的方法,简单修改如下:在0.5%浓度的LB或鳃弧菌培养基中加入1%低电渗型琼脂糖与0.02%(V/V)Tween-20,高压灭菌,待培养基冷却至50℃左右时加入200μl稀释好的菌液,迅速混匀,将约7ml含菌的培养基倒入直径9cm的培养皿中,待培养基彻底凝固后在培养基上打直径3.5mm的孔,每孔加15μl稀释100倍、稀释10倍和未稀释的血浆,室温放置3h后,倒置分别在37℃培养溶壁微球菌与28℃培养鳃弧菌。待抑菌圈明显可见时,采用考马斯亮蓝R-250固定及染色。

液体培养基微量稀释检测法(microtiter broth dilution assay):参照du Toit等(2000)的方法,简单修改如下:在无菌的96孔板中每孔加100μl液体LB或鳃弧菌培养基,然后每孔再加100μl稀释好的菌悬液,加入30μl稀释100倍、稀释10倍和未稀释的血浆后轻微振荡使之混匀,不同细菌分别在37℃与28℃培养24h,用酶标仪分别检测培养12、18、24h后450nm波长下的OD值。

所有空白对照均为与不同稀释度对虾血浆蛋白浓度相同的牛血清白蛋白溶于对虾抗凝剂溶液。

1.5 血细胞数目的测定

采用血球计数板统计自然状态和鳃弧菌免疫前后的中国明对虾血细胞数目。

1.6 蛋白浓度的测定

蛋白浓度的测定采用Bradford(1976)方法。

1.7 中国明对虾血淋巴抗菌活性物质的初步分离与检测

采用筛选出的比较灵敏的方法检测灭活鳃弧菌攻毒前后中国明对虾血浆和血细胞的抑菌活性。

取诱导后的中国明对虾血淋巴10ml,超声波组织匀浆机处理,15000g离心取上清液,4℃平衡缓冲液透析,预先用0.02mol/L、pH6.5的醋酸铵缓冲液平衡的CM-Sepharose FF(Amersham)(1×10cm)柱层析,洗脱条件:pH6.5、0.02mol/L醋酸铵缓冲液洗脱,0.02mol/L醋酸铵缓冲液与含0.5mol/L NaCl的0.02mol/L醋酸铵缓冲液梯度洗脱,然后用0.5—1.0mol/L NaCl的0.02mol/L醋酸铵缓冲液梯度洗脱。流速0.2ml/min,每管收集1.6ml,检测每管收集液的抗菌活性。

1.8 数据分析

采用 Origin 软件进行作图与数据分析。

2 结果

2.1 不同抑菌检测方法的优化

普通抑菌圈法的抑菌效果:不同稀释度的血

浆与抑菌圈的大小呈现明显相关性。表 1 显示了加入不同稀释度的血浆在抑菌活性检测中抑菌圈的大小,30 μ l 稀释 100 倍、稀释 10 倍的血浆几乎检测不到抑菌活性。30 μ l 未稀释血浆原液的抑菌圈面积为(235.5 \pm 28.4)mm²(表 1)。

表 1 普通抑菌圈法的抑菌圈大小与样品量的关系

Tab. 1 Relationship between inhibition effect and sample amount, revealed by inhibition zone assay

不同稀释度血浆		稀释 100 倍	稀释 10 倍	未稀释
抑菌圈面积(mm ²)	<i>M. luteus</i>	—	—	235.5 \pm 28.4
	<i>V. anguillarum</i>	—	—	198.2 \pm 31.5

注:表中数值为三次重复的平均值。孔径为 5.0mm,加样 15 μ l

辐射扩散法的抑菌效果:不同稀释度的血浆与抑菌圈的大小同普通抑菌圈法一样呈现明显的正相关性。但在加样量只有前者一半的情况

下抑菌效果要远远优于前者,稀释度为 100 倍的血浆检测不到抑菌能力,稀释度为 10 倍及未稀释的血浆表现出明显的抑菌作用(表 2)。

表 2 辐射扩散法的抑菌圈大小与样品量的关系

Tab. 2 Relationship between inhibition effect and sample amount, determined by radial diffusion assay

不同稀释度血浆		稀释 100 倍	稀释 10 倍	未稀释
抑菌圈面积(mm ²)	<i>M. luteus</i>	—	95.3 \pm 18.2	294.7 \pm 35.2
	<i>V. anguillarum</i>	—	86.8 \pm 16.5	275.6 \pm 32.1

注:表中数值为三次重复的平均值。孔径为 3.5mm,加样 15 μ l

液体培养基微量稀释检测法:30 μ l 稀释 100 倍的血浆即表现出对溶壁微球菌和鳃弧菌的比较明显的抑制作用,但是随着血浆浓度的提高,抑菌效果表现出下降趋势。加入 30 μ l 稀释 10 倍的血浆没有抑菌效果,当加入 30 μ l 未稀释血浆原

液时光吸收值反而增加。培养时间对这种方法影响也很明显,培养 12h 与 24h 由于细菌生长不明显或者细菌增殖过多,导致抑菌效果均不明显,而培养 18h 时检测抑菌效果较好(表 3)。

表 3 液体培养基微量稀释检测法的抑菌效果

Tab. 3 Relationship between inhibition effect and sample amount using microtiter broth dilution method

不同稀释度血浆		稀释 100 倍	对照	稀释 10 倍	对照	未稀释	对照
<i>OD</i> _{450nm}	<i>M. luteus</i>	0.185 \pm 0.05	0.254 \pm 0.07	0.268 \pm 0.06	0.276 \pm 0.02	0.635 \pm 0.04	0.612 \pm 0.03
	<i>V. anguillarum</i>	0.157 \pm 0.03	0.209 \pm 0.04	0.245 \pm 0.05	0.262 \pm 0.03	0.569 \pm 0.06	0.545 \pm 0.04

注:培养 18h,加样量为 30 μ l,表中数值为 3 次平行试验的平均值

2.2 中国明对虾血淋巴抗菌活性的测定

2.2.1 中国明对虾血细胞数目的变化 注射鳃弧菌后中国明对虾血细胞数量明显降低,最低值出现在注射后 45min($P < 0.05$),随后血细胞数目缓慢回升,但是 24h 时仍然低于注射前水

平(图 1)。

2.2.2 中国明对虾血浆和血细胞抗菌活性的测定 利用改进的辐射扩散法检测中国明对虾血浆和血细胞的抑菌活性,样品孔直径 3.5mm,加样量均为 15 μ l,结果表明,鳃弧菌诱导后,血细

胞对鳗弧菌和溶壁微球菌的抑菌活性均明显增强,较高的抑菌活性出现在诱导后3—12h ($P < 0.05$),但是血浆抑菌活性增加不明显 ($P > 0.05$) (图2)。提示血细胞在免疫反应中具有重要作用。

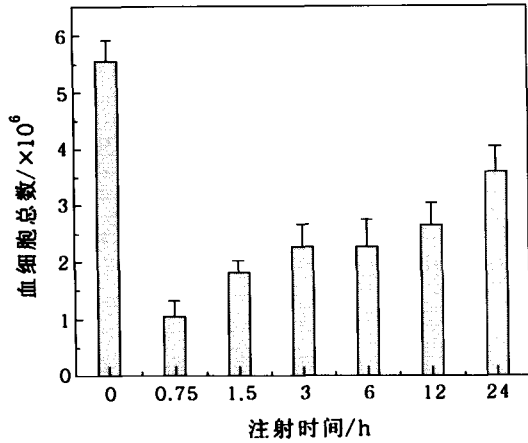


图1 鳗弧菌诱导前后不同时间中国明对虾血细胞总数的变化 ($n = 10$)

Fig. 1 Total haemocyte counts of *F. chinensis* before and after *V. anguillarum* challenge ($n = 10$)

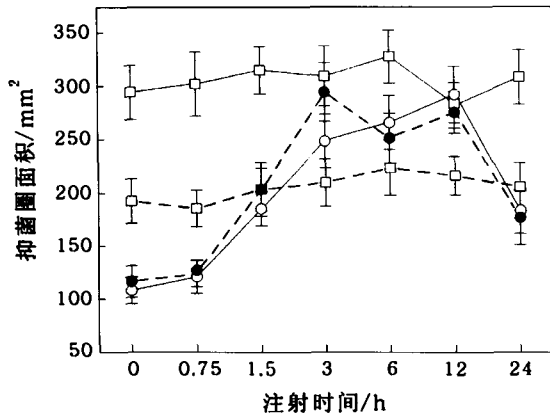


图2 鳗弧菌诱导前后不同时间中国明对虾血浆和血细胞在抑菌活性变化

Fig. 2 Changes of antimicrobial activity of plasma and haemocytes in *F. chinensis* before and after *V. anguillarum* challenge

—□— 血浆对溶壁微球菌的抑制能力, —○— 血浆对鳗弧菌的抑制能力, —●— 血细胞对溶壁微球菌的抑制, —○— 血细胞对溶壁微球菌的抑制

2.2.3 对中国明对虾血淋巴抗菌活性物质的柱层析分离过程中抗菌活性的检测 采用 Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱层析方法对中国明对虾血淋巴中抗菌活性物质进行初步分离,分离

到4个蛋白吸收峰,利用液体培养抑菌检测法对洗脱液进行抑菌活性检测,结果表明其中24—32号收集液具有对溶壁微球菌和鳗弧菌的抑菌活性(图3),而采用辐射扩散法仅检测出27—31号收集液的抑菌活力。收集液对鳗弧菌的抑菌能力与溶壁微球菌相比未表现出明显差异。具有抑菌活性的收集液在离子浓度为0.6—0.9mol/L时被洗脱下来,说明此抑菌物质与阳离子交换柱结合能力较强,推测其等电点比较高。

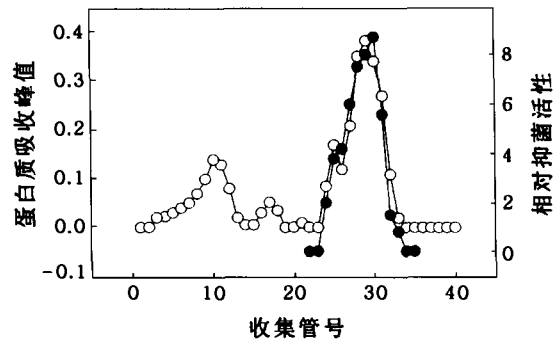


图3 中国明对虾血淋巴 CM-Sepharose FF 柱层析图谱

Fig. 3 Elution profile of *F. chinensis* haemolymph using CM-Sepharose FF column chromatography

分离到四个蛋白洗脱峰,用液体培养基微量稀释检测法对每个收集液的抗菌活性进行检测,24—32号收集液具有抑菌活性。—○—蛋白质在280nm下的吸收,—●—相对抑菌活性

3 讨论

传统的抑菌圈法在抑菌活性检测中应用最为广泛,辐射扩散法在它的基础上经过改进并且应用较为广泛,液体培养基微量稀释检测法是最近发展起来的一种抑菌检测方法。本文中作者通过比较及改进不同的抗菌活性检测方法,认为液体培养基微量稀释检测法是一种比较好的抑菌活性检测方法:(1)检测时间缩短,固体培养基抗菌检测时间一般需要24—48h,作者的实验结果证明液体培养基微量稀释检测法培养18h后检测效果较好。(2)采用96孔板使得这一方法更为精确、灵敏、简便,由于所有数据均采用酶标仪自动读数,减少了人为测量抑菌圈产生的误差,测量的准确度大大提高。(3)采用液体培养基,不需要加入琼脂或琼脂糖,更为经济简便。(4)培养基用量更少,测试样本量大,重复性好,适于大批量样本的检测研究,特别是在生物体内抗菌物质或者体外表达具有抗菌活性的重组蛋

白的纯化过程中抑菌活性部分的检测具有特殊的意义,是一种简单、快速、高通量的检测方法。

但是由于中国明对虾血淋巴材料的特殊性,如蛋白质与多糖成分比较特殊,如果直接采用液体培养基微量稀释检测法检测会增加反应体系的复杂性,血蓝蛋白等有色物质也会影响比色时光密度值的测定。因此,对蛋白含量较高的血淋巴原液采用辐射扩散法检测效果较好。辐射扩散法具有较高的灵敏度,将其中的琼脂改为低电渗型琼脂糖,减少了样品与带负电荷的硫酸盐的静电作用和琼脂中琼脂胶的糖残基的相互作用(Lehrer *et al*, 1991)。在培养基中加入 Tween-20 有助于维持样品的稳定性。比较薄的培养基,直径为 3.5mm 的加样孔减少了样品的使用量,而且灵敏度与传统的抑菌圈法相比大大提高。由于生物样品的复杂性和特殊性,因此针对不同样品,将检测效果比较好的方法结合使用会得到更好的结果。海洋甲壳动物之间血淋巴的组成具有相似性,因此这一方法在海洋无脊椎动物免疫抗菌因子的检测中具有普遍的应用意义。

血细胞总数与许多因素有关,在一定程度上,它反映了对虾的健康状态。较低的血细胞数量总是与对病原较差的抵抗力有关, van de Braak 等(2002)报道对斑节对虾注射弧菌后血细胞数量明显低于对照组。血细胞数量的下降可能是由于血细胞迁移到注射部位和血细胞的裂解引起的(Omori *et al*, 1989),血细胞还可能迁移到非循环部位或者移到感染部位,形成黑色素(Martin *et al*, 1998)。另外,龙虾(*Homarus americanus*)的血细胞吞噬细菌后可能离开循环体系而进入心脏,连接组织、鳃或其他的血窦(Factor *et al*, 1990)。本研究中发现注射鳃弧菌后血细胞数量明显减少,推测这是由于参与了细胞防御细菌入侵的免疫反应引起的。

许多研究结果证实抗菌因子的表达是受到诱导的(Hultmark *et al*, 1980; Alabi *et al*, 2000; 郭振宇等, 2001),本研究结果也表明中国明对虾血浆中存在抑菌活性物质,但受到鳃弧菌刺激后中国明对虾血浆的抑菌活力变化不明显,说明血浆在防御外界环境中的少量致病或非致病性的微生物的过程中有一定的防御作用,但不直接应答外来细菌的强烈刺激。而血细胞在受到鳃弧菌攻毒后数量明显减少,说明血细胞在防御外来细菌的过程中由于吞噬、包囊和裂解作用导致其数

量减少。但是它的抑菌活力明显增强,推测免疫反应诱导了储存的抗菌因子的释放或新的抗菌因子的合成,详细机制有待于深入研究。在对血浆抗菌物质的分离过程中,液体培养基微量稀释检测法在测试成分相对简单的样品时充分体现了其灵敏度高,高通量,检测时间短和更为准确和经济等优点。本实验的测试结果表明抗菌因子的 pH 值较高也与 Destoumieux 等(1997)从对虾中分离到的抗菌肽以及大多数昆虫抗菌肽的等电点较高一致(Boman, 1995)。

总而言之,血淋巴是对虾重要的免疫防御系统,血浆在体液免疫中起到了重要作用,血细胞在受到病原刺激后血细胞数量会明显减少,但是其抗菌活性却明显增加,说明细胞免疫在直接吞噬和杀灭外源微生物的过程中扮演了极其重要的作用,而且在病原刺激下血细胞中抗菌因子的合成大大加强。

参 考 文 献

- 王 雷,李光友,毛远兴,1995. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究. 海洋与湖沼, 26(2): 179—185
- 李春猛,战文斌,马 铎等,1999. 中国对虾血淋巴抗菌活力的测定. 青岛海洋大学学报, 29(4): 599—603
- 郭振宇,相建海,2001. 中国对虾免疫诱导多肽的毛细管区带电泳差异显示. 见:相建海主编. 海水养殖生物病害发生与控制. 北京:海洋出版社, 118—122
- 雷质文,黄 健,杨 冰等,2001. 96 孔酶标板法测定中国对虾血淋巴上清液抗菌活力和酚氧化酶活性的初步研究. 海洋湖沼通报, (4): 33—37
- Alabi A O, Latchford J W, Jones D A, 2000. Demonstration of residual antibacterial activity in plasma of vaccinated *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 187: 15—34
- Barry A L, 1980. Procedure for Testing Antibiotics in Agar Media: Theoretical Considerations. In: Lorian V ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1—23
- Boman H G, 1995. Peptide antide antibiotics and their role in innate immunity. Annu Rev Immunol, 13: 61—92
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248—254
- Chisholm J R S, Smith V J, 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. Comp Biochem Physiol, 110A: 39—45
- Depledge M H, Bjeregaard P, 1989. Hemolymph protein com-

- position and copper levels in decapod crustaceans. *Helgol Meeresunters*, 43:207—223
- Destoumieux D, Bulet P, Loew D *et al*, 1997. Penaeidins, a new family of anti-microbial peptides isolated from the shrimp, *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem*, 272:28398—28406
- du Toit E A, Rautenbach M, 2000. A sensitive standardized micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*, 42:159—165
- Factor J R, Beekman J, 1990. The digestive system of the lobster, *Homarus americanus*: III. Removal of foreign particles from the blood by fixed phagocytes of the digestive gland. *Journal of Morphology*, 206:293—302
- Haug T, Kjuul A K, Stensvag K *et al*, 2002. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish and Shellfish Immunology*, 12:371—385
- 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
- Lehrer R I, Rosenman M, Hatrwig S S L *et al*, 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *Journal of Immunological Methods*, 137:167—173
- Martin G G, Kay J, Poole D *et al*, 1998. In vitro nodule formation in the ridgeback prawn, *Sycyonia ingentis*, and the American lobster, *Homarus americanus*. *Invertebrate Biology*, 117:155—168
- Moullac G L, Haffner P, 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture*, 191:121—131
- Omori S A, Martin G G, Hose J E, 1989. Morphology of hemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn, *Sycyonia ingentis*. *Cell Tissue Research*, 255:117—123
- Rochu D, Fine J M, 1978. Antigenic structure of the hemocyanin in six species of decapod Crustacea. *Comp Biochem Physiol*, 59A:145—150
- Söderhäll K, Cerenius L, 1992. Crustacean Immunity. In: *Annual Rev of Fish Dis*. Pergamon Press, Oxford, 2:3—23
- Song Y-L, Yu T W, Huang C C *et al*, 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 14:317—331
- Sritunyalucksana K, Sithisarn P, Withayachumnarnkul B *et al*, 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish and Shellfish Immunology*, 9:21—30
- Steinberg D, Lehre R I, 1997. Designer Assays for Antimicrobial Peptides; Disputing the 'One Size Fits All' Theory. In: Shafer W M ed. *Methods in Microbiology*. Humana Press, Totowa, N J, 169—187
- van de Braak C B T, Botterblom M H A, Taverne N *et al*, 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio bacteria* in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 13 (4): 293—309
- Vargas-Albores F, Guzman M A, Ochoa J L, 1993. An anticoagulant solution for hemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp Biochem Physiol*, 106A(1):299—303

CHANGES IN ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLASMA AND HAEMOCYTES IN *FENNEROPENAEUS CHINENSIS* CHALLENGED BY KILLED *VIBRIO ANGUILLARUM*

YAO Cui-Luan^{1, 2}, WU Chang-Gong², XIANG Jian-Hai²

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Infection by pathogen represents one of the major threats to culture shrimp. The mechanism of immune defense was widely investigated because of the serious disease in the past ten years. Many antibacterial proteins and peptides were identified and cloned in shrimps. However, the changes of antibacterial activity in blood of Chinese shrimp after infected by bacteria are not known.

In this study the antibacterial methods inhibition zone assay, radial diffusion assay and microtiter broth dilution method were improved and compared in detecting the antibacterial activity in the hemolymph of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* after *Vibrio anguillarum* challenge. The most stable and sensitive method was used to detect the antibacterial ability of the plasma and haemocyte lysis solution (HLS) in the shrimp. *Micrococcus luteus* (G^+) and *Vibrio anguillarum* (G^-) were used as testing bacteria. The antibacterial activity of every fraction of hemolymph, which were separated by cation column chromatography, was also tested by these antibacterial methods.

The results demonstrated that the most sensitive antibacterial method was microtiter broth dilution assay. The antibacterial activity of the plasma in Chinese shrimp could be detected when the sample was diluted 100 times. Cultivation time is important in this method. The antibacterial activity could be detected at the 1/10 concentration of shrimp plasma using radical diffusion assay. Inhibition zone assay was demonstrated to be the most insensitive antibacterial assay. The antibacterial activity could be tested only in the sample without any dilution using inhibition zone assay method. Radial diffusion assay was proved to be an effective antibacterial assay method when shrimp plasma was not diluted or when the sample with high protein concentration.

The results also showed that the total haemocyte counts (THC) of *F. chinensis* significantly decreased after challenged with *V. anguillarum*. The lowest THC value was decreased by 73% relative to control group, which appeared at 45min ($P < 0.05$) after dead *V. anguillarum* injection, then increased and recovered to pre-injection level at 48h after the injection. Using improved antibacterial method, the antibacterial activities of HLS and plasma of Chinese shrimp, *F. chinensis* were tested before and after injection with dead *V. anguillarum*. The antibacterial activity of HLS increased significantly after bacteria challenge, higher activity appeared from 3 to 12h ($P < 0.05$) after dead *V. anguillarum* injection, then decreased and recovered to that of the control level at 24h after injection. However, there was no obvious change in antibacterial activity in plasma ($P > 0.05$) after dead vibrio challenge. The results suggested that the expression of antibacterial factors in haemocytes were greatly increased after immuno-stimulation.

Four spikes were identified on the fast flow column chromatography for CM-Sepharose, and the antibacterial fractions were eluted from No. 24—32 when each fraction was tested by microtiter broth dilution method.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*, Antibacterial methods, Antimicrobial activity