

日本对虾血清凝集素及其免疫作用的初步研究

廖绍安, 李 筠, 张晓华, 纪伟尚, 徐怀恕

(青岛海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘 要:用日本对虾(*Penaeus japonicus*)亲虾的血清与11株弧菌和7种脊椎动物的红细胞进行凝集反应实验,其中,溶藻弧菌HW283的凝集效价最高,达4 096,而产气弧菌和海螵弧菌的凝集效价最低,仅为8;与红细胞的凝集结果显示,对虾血清与大白鼠、小白鼠、豚鼠的红细胞反应较强,与鸡、人、山羊、兔的红细胞反应较弱。表明日本对虾血清中存在自然凝集素。养成期的日本对虾经弧菌苗免疫后,对该致病菌株的抵抗力获得提高。病原感染组、对照组和菌苗免疫组的对虾血清分别对豚鼠、大白鼠和小白鼠红细胞的凝集强度皆为感染组>对照组>免疫组。

关键词:日本对虾;凝集素;免疫

中图分类号:S945.45

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)03-0224-04

对虾等甲壳动物缺乏象脊椎动物那样的特异性免疫^[1,2],但在其体液中自然存在的凝集素也具有免疫功能。凝集素作为具有与糖专一性结合并能促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白,在生命活动中发挥重要作用^[3,4]。日前,对虾等无脊椎经济动物的免疫研究日益受到广泛重视,研究较多的是斑节对虾(*Penaeus monodon*),Adams^[5]用热灭活的溶藻弧菌和活的创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)对斑节对虾凝集素的变化与免疫作用进行了研究。本文以日本对虾(*Penaeus japonicus*)为材料,研究其在病原感染和菌苗免疫时的血清凝集素凝集活性的变化特征,旨在探讨日本对虾血清凝集素与其免疫的关系。

1 材料与方法

1.1 生物样本

日本对虾亲虾体长19.0~24.5 cm,养成期日本对虾体长8.0~9.5 cm,均取自山东莱州大华水产养殖公司。弧菌标准菌株:鳃弧菌(*Vibrio an-*

guillarum) HW72、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) HW283和HW284、肋生弧菌(*V. costicola*) HW288、弗尼斯弧菌(*V. furnissi*) HW293、产气弧菌(*V. gazogenes*) HW294、海螵弧菌(*V. nereis*) HW301、创伤弧菌(*V. vulnificus*) HW310、火神弧菌(*V. logei*) HW315,以及2株对虾致病菌哈维氏弧菌(*V. harveyi*) E18和Z₃G₂,均为本实验室保存。7种血液取自大白鼠、小白鼠、豚鼠、兔、鸡、山羊、人。

1.2 对虾血清的制备

从日本对虾亲虾心脏无菌抽取血淋巴,注入洁净无菌的Eppendorf离心管中,在28℃放置1 h,划破血凝块,离心,将血清转入洁净无菌的Eppendorf离心管中,加入叠氮化钠,使之终质量分数为0.05%, -25℃保存。

1.3 细胞悬液的制备

用无菌生理盐水将2216E斜面培养的实验菌株的新鲜菌苔洗下,制备细胞悬液,离心(2 000 r/min, 15 min)、洗涤、离心,再用TBS缓冲液同样洗涤、离心2次;在Alsevers液中4℃保存的动物血液,同样经离心、洗涤。将所得压积细胞用TBS缓冲液制成1%的细胞悬液备用。

1.4 血清凝集效价的测定

收稿日期:2001-04-01.

基金项目:欧盟委员会资助项目(TS3-T94-0269).

作者简介:廖绍安(1970-),男,现中科院南海海洋研究所博士研究生.

取制得的血清加入 96 孔板的第 1 列孔中, 每孔 50 μL 用 TBS 作 2 倍系列稀释; 往每孔血清中加入 50 μL 1% 的细胞悬液, 混匀, 28 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 45~60 min, 在显微镜($\times 100$)下检测其凝集强度。凝集强度分 +4、+3、+2、+1、0 共 5 个级别, 以出现 +1 的最高稀释倍数作凝集效价。

1.5 注射感染和菌苗免疫

1.5.1 活菌悬液和菌苗的制备 将培养 24 h 的 E18 菌株制成菌悬液。取部分菌悬液用终质量分数 0.1% 的福尔马林 28 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 12 h, 经 3 次生理盐水离心洗涤除去福尔马林, 制成菌苗。

1.5.2 注射 将充分暂养的实验用虾分设感染、免疫、对照 3 组, 用 2.0×10^7 、 2.0×10^8 、 $2.0 \times 10^9/\text{mL}$ 3 个梯度的菌悬液和菌苗悬液注射, 每个梯度设 2 个平行, 每个平行 10 尾虾, 每尾注射 0.04 mL, 对照组注射生理盐水。记录每个梯度平均存活数。保持水体清洁, 通气, 正常投饵。

1.5.3 二次人工感染 第 1 次注射 72 h 后从对

照组和菌苗浓度为 2.0×10^7 、 $2.0 \times 10^8/\text{mL}$ 的免疫组中各取 10 尾存活的对虾, 用浓度为 $2.0 \times 10^8/\text{mL}$ 的活菌悬液进行第 2 次人工感染, 注射剂量、管理方法同上, 记录存活数。

1.5.4 血清制备和凝集活性检测 分别从感染组中垂死的对虾、对照组和免疫组 72 h 后的存活对虾的心脏中无菌抽取血淋巴, 血清制备同 1.2, 凝集活性检测同 1.4。

2 结果与分析

2.1 对虾血清与细菌和血细胞的凝集反应

用 11 株弧菌和 7 种脊椎动物的红细胞进行检测, 发现日本对虾血清与所用的实验细胞都能发生凝集, 与 11 株弧菌发生凝集强度差别很大, 其中溶藻弧菌 HW284 的凝集效价最高, 达 4 096, 而产气弧菌和海螵弧菌的凝集效价最低, 仅为 8; 与红细胞的凝集结果显示, 对虾血清与大白鼠、小白鼠、豚鼠的红细胞反应较强, 与其他 4 种反应较弱(表 1)。

表 1 日本对虾血清对弧菌和动物红细胞的凝集作用

Table 1 Agglutination of the strains of *Vibriosis* and seven kinds of erythrocyte with the serum from *P. japonicus*

细菌或红细胞 Bacteria or erythrocyte	对虾血清凝集的效价 Agglutination titre	细菌或血细胞 Bacteria or erythrocyte	对虾血清凝集的效价 Agglutination titre
E18 哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	1024	HW310 创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	512
Z ₃ G ₂ 哈维氏弧菌 <i>V. Harveyi</i>	1024	HW315 火神弧菌 <i>V. logei</i>	128
HW272 鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	16	大白鼠 Rat	5
HW283 溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	4096	小白鼠 Mouse	1024
HW284 溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	32	豚鼠 Guinea pig	1024
HW288 肋生弧菌 <i>V. costicola</i>	512	鸡 Chicken	256
HW293 弗尼斯弧菌 <i>V. furnissi</i>	128	人 Human	128
HW294 产气弧菌 <i>V. gazogenes</i>	8	山羊 Goat	32
HW301 海螵弧菌 <i>V. nereis</i>	8	兔 Rabbit	32

2.2 哈维氏弧菌 E18 对日本对虾的毒性和菌苗免疫效果

对健康的日本对虾进行肌肉注射, 分别注射无菌生理盐水(对照组)、E18 菌体(感染组)、E18 菌体制成的菌苗(免疫组), 按常规投饵、换水、通气, 每隔 4 h 观察 1 次, 连续观察记录 3 d。结果见表 2(删除了数量变化不明显时间段的记录), 由表 2 可知: ①对照组注射无菌生理盐水, 对虾无死亡, 也说明肌肉注射对虾体的损伤不影响对虾的存活率; ②感染组对虾死亡率高, 并且随着所注射菌悬液浓度的加大死亡率迅速上升, 注射浓度为 $2.0 \times 10^7/\text{mL}$ 组对虾 72 h 已有半数死亡; $2.0 \times 10^8/\text{mL}$ 组的 8~16 h 死

亡率达 80%, $2.0 \times 10^9/\text{mL}$ 的 4~12 h 死亡率达 90%, 哈维氏弧菌 E18 菌株对日本对虾有强的致死作用; ③菌苗的毒性大大低于相同浓度菌悬液的毒性, 免疫组注射菌苗浓度为 $2.0 \times 10^7/\text{mL}$ 的对虾没有死亡, 浓度为 $2.0 \times 10^8/\text{mL}$ 、 $2.0 \times 10^9/\text{mL}$ 菌苗, 注射 72 h 后对虾死亡率分别是 10% 和 40%, 浓度高的菌苗对对虾造成的死亡率较高, 菌苗浓度为 $2.0 \times 10^7/\text{mL}$ 时对试验对虾安全。

对经 $2.0 \times 10^7/\text{mL}$ 和 $2.0 \times 10^8/\text{mL}$ 的菌苗免疫过的对虾再注射浓度为 $2.0 \times 10^8/\text{mL}$ 的 E18 菌悬液进行胁迫试验, 结果表明: 这 2 组对虾对它的抵抗能力相同, 存活率比对照组的高(表 3)。可见,

表2 日本对虾活菌注射感染和菌苗免疫的成活情况
Table 2 Survival numbers of *Penaeus japonicus* infected and vaccinated by E18

时间 Time	对照组/ind Control	感染组成活数/尾 Survival nos. in challenged group			免疫组成活数/尾 Survival nos. in vaccinated group		
		①	②	③	①	②	③
0	10	10	10	10	10	10	10
4	10	10	10	10	10	10	10
8	10	10	10	6	10	10	10
12	10	9	8	1	10	10	10
16	10	7	2	0	10	10	10
32	10	6	1		10	10	7
72	10	5	1		10	9	6

①—③: 注射悬液疫苗浓度分别为 2×10^7 、 2×10^8 、 2×10^9 /mL.
Concentrations of E18 or vaccine injected are 2×10^7 , 2×10^8 and 2×10^9 /mL, respectively.

表3 对照组和免疫组再感染后的存活数

Table 3 Survival numbers of control and vaccinated *P. japonicus* after the second infection

分组 Group	时间/h Time				
	0	6	12	18	24
免疫组 1 Vaccinated group 1	10	9	6	4	2
免疫组 2 Vaccinated group 2	10	9	6	4	2
对照组 Control	10	7	4	1	0

注: 免疫组 1 和免疫组 2 分别是经浓度为 2.0×10^7 /mL 和 2.0×10^8 /mL 的菌苗免疫过的对虾; 对照组是注射生理盐水后存活的对虾。Groups 1 and 2 have been vaccinated with 2.0×10^7 and 2.0×10^8 /mL vaccine. Control means survival numbers after injection of physiological saline.

2.0×10^7 /mL 的菌苗免疫效果较好。

2.3 感染组和免疫组日本对虾血清的凝集活性

同时将感染组、免疫组及对照组对虾血清与豚鼠、小白鼠和大白鼠红细胞进行凝集反应, 其凝集强度为: 感染组 > 对照组 > 免疫组, 彼此之间相差 1 倍, 3 种红细胞凝集反应结果趋势一致 (图 1)。

3 讨论

本研究证实日本对虾血清中有凝集素存在。这些血清中的凝集素在体外均能与所试弧菌菌株发生凝集, 但其凝集程度有所不同, 这种体外的凝集差别可能反映了凝集素在体内对不同细菌的作用能力不同; 其中 E18 是本室分离的对虾病原菌, 对虾血清对其凝集效价较高, 为 512。可见, 对虾血清中的凝集素在清除侵入体内病原菌的过程中有积极作用。

并在对虾免疫抗病方面具有重要意义。Ueda 等^[7]报道了 6 种海洋甲壳类动物血淋巴中的自然凝集素 (非诱导的) 对海洋细菌有凝集作用, 尤其是对弧菌属的细菌。凝集素作为具有与糖专一性结合并能促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白, 广泛存在于生物体内^[3], 自然存在或经诱导产生^[5-6], 凝集素是对虾免疫的重要组成部分^[5-6, 8-9]。本研究所用的日本对虾均未经任何人工诱导处理, 即有凝集素存在。

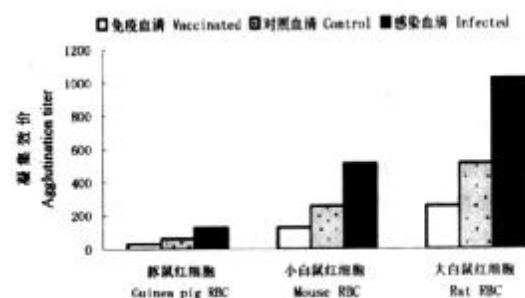


图1 3种动物的红细胞与3种血清的凝集效价

Fig.1 Agglutination titres of three kinds of erythrocytes by three kinds of serum

经弧菌细胞疫苗免疫后的对虾对同一株细菌的抵抗能力有所增强。由于对虾等甲壳动物缺乏脊椎动物所具有的特异性免疫系统, 因此经诱导后对虾体内的免疫体系所发生的变化, 是非特异性的, 但是对进入虾体内的异物也具有一定的识别和消除的免疫作用, 所以经菌苗细胞诱导后虾体对含有高毒性的菌悬液的胁迫有较强的抵抗力。尽管已经知道诱导会引起对虾免疫体系的变化, 包括血细胞因子和体液因子如凝集素、酚氧化酶原系统以及杀菌肽等^[1, 4, 10], 但是诱导对非特异性免疫的提高程度所依赖的因素尚需进一步研究。

经检测免疫组、对照组、感染组对虾血清的凝集效价, 发现凝集能力后者依次比前者高 1 倍。按照 Adams^[5]和罗日祥^[9]的观点, 认为对虾血淋巴中的凝集素活力明显增强是在感染或免疫后的短时间内发生和存在的, 因此, 感染组对虾血清的凝集活性最高, 可能是注射后较短时间内取血所致, 即感染组的对虾在短时间内即有死亡, 其血清来自垂死的对虾; 而免疫组和对照组的对虾血清是注射后 72 h 抽取的。而比较注射和取血时间相同的免疫组和对照组, 免疫组的凝集素对 3 种试验动物的血细胞凝集活力是对照组的一半, 可能是菌苗免疫诱导了凝集素的上升, 但同时疫苗要消耗一部分凝集素而被减

少的缘故,这种推测需经进一步实验验证。

参考文献:

- [1] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学, 1995, 4: 1-3.
- [2] 张晓华, 纪伟尚, 徐怀恕. 甲壳动物免疫学进展[A]. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制. 欧盟欧洲委员会资助项目研究论文集[C]. 北京: 海洋出版社, 1999. 158-165.
- [3] 孙 册, 朱 政, 莫汉庆. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986. 4.
- [4] 李桂生, 纪伟尚, 徐怀恕, 等. 对虾体内酚氧化酶活性规律的初步研究[A]. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制. 欧盟欧洲委员会资助项目研究论文集[C]. 北京: 海洋出版社, 1999. 122-127.
- [5] Adams A. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species [J]. Fish Shellfish Immunol, 1991, 1(1): 59-70.
- [6] Lee K K, Chen F R. Studies on the pathogenicity of *Vibrio damsela* isolated from diseased tiger prawn (*Penaeus monodon*) [J]. Coa Fish Ser, 1994, 47: 21-36.
- [7] Ueda R, Sugita H, Deguchi Y. Naturally occurring agglutinin and bactericidal activity in the haemolymph of coastal Crustacea [C]. The Second Asian Fisheries Forum, Tokyo, 1990. 461-464.
- [8] 刘 恒, 李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(2): 113-117.
- [9] 罗日祥. 中国对虾凝集素活力及弧菌的诱导动力学[J]. 海洋学报, 1997, 19(4): 117-120.
- [10] 许 兵, 纪伟尚, 徐怀恕. 麦胚凝集素促进对虾免疫功能的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1992, 22(4): 29-34.

Agglutinin in serum of *Penaeus japonicus* and its immune function

LIAO Shao-an, LI Yun, ZHANG Xiao-hua, JI Wei-shang, XU Huai-shu

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: Using the serum of parents *Penaeus japonicus* to conduct the agglutinating reaction with 11 strains of *Vibrios* and erythrocytes of seven vertebrates, the results show that the agglutination titer of *B. alginolyticus* HW283 to the serum is the highest, which is 4 096, and the lowest agglutination titers appear in *V. nereis* HW301 and *V. gazogenes* HW294, which are both 8. The results of the agglutination of the serum to the erythrocytes of the animals show that the serum of *P. japonicus* has strong agglutinating reaction with the erythrocytes of rat, mouse and Guinea pig but weak reaction with those of chicken, human, goat and rabbit. All those imply that there exists naturally occurring agglutinin in the serum of *P. japonicus*. During the culture period the prawns were challenged with *V. harveyi* E18 (infection group) or vaccinated with formalin-killed E18 (vaccination group) by injection and the serum hemagglutination assay to different types of erythrocytes was performed. The agglutinating intensity of prawn serum in the groups of infection, vaccination and control to the erythrocytes of Guinea pig, rat and mouse, respectively, all show infection group > control > vaccination group.

Key words: *Penaeus japonicus*; agglutinin; immunity

欢迎订阅《渔业致富指南》杂志

邮发代号: 38-320 国内统一刊号: CN42-1279/F

《渔业致富指南》杂志系目前我国水产业出版周期最短、传递信息最快的水产科技期刊, 读者遍布全国, 深受广大读者欢迎。本刊主要辟有渔业信息、致富典型、专家论坛、水产养殖实用技术、名特优水产品养殖、鱼类病害防治技术、养殖技术专题讲座、海水养殖、科研园地、读者信箱、水产商情等栏目。

本刊为半月刊, 彩封, 大32开本, 每月10日、25日出版。每期定价2.00元, 全年24期48元。全国各地邮局均可办理订阅手续。如当地邮局订阅不便, 请读者直接汇款至本刊编辑部订购, 本刊常年办理订阅和补订手续(免收邮资费)。本刊地址: 湖北省武汉市武昌东湖路96号, 邮编: 430071; 联系电话: 027-87812348, 传真: 027-87311934, 联系人: 黄凯勤。