

文章编号:1005-8737(2000)03-0028-05

## 细菌糖蛋白对螯虾免疫因子的影响

莫照兰<sup>1</sup>, 李会荣<sup>1</sup>, 俞勇<sup>1</sup>, 王祥红<sup>1</sup>, 纪伟尚<sup>1</sup>, 徐怀恕<sup>1</sup>, P. S. Sudheesh<sup>2</sup>

(1. 青岛海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. Central Institute of Brackishwater Aquaculture, 141-Marshalls Road, Egmore, India)

**摘要:**实验检测了气味黄杆菌的胞外糖蛋白对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的几种非特异性免疫因子—凝集素、酚氧化酶、溶菌、抗菌和超氧化物歧化酶等活力的影响。注射10 mg 糖蛋白后, 实验组螯虾血清的免疫因子活力均高于对照组, 凝集素活力在第1~4天最高; 酚氧化酶在第1~5天维持较高活力, 最大活力在第2天, 溶菌、抗菌活力在第1~6天维持较高水平, 分别在第3天、第2天达到最大。与对照组相比, 实验组螯虾肌肉的溶菌和抗菌、超氧化物歧化酶活力没有明显的变化。结果表明: 气味黄杆菌的胞外糖蛋白可增强螯虾血淋巴的凝集素、酚氧化酶、溶菌和抗菌活力。

**关键词:** 气味黄杆菌; 糖蛋白; 克氏原螯虾; 凝集素; 酚氧化酶; 溶菌; 抗菌; 超氧化物歧化酶

**中图分类号:** S942.5

**文献标识码:** A

提高动物的自身免疫力是抗病的途径之一。无脊椎动物缺乏脊椎动物所具有的特异性免疫, 但它们仍具有辨别和清除异己成分的防御体系。有关研究发现, 甲壳动物具有非特异性的细胞防御因子和体液免疫因子, 一些外源物质可提高免疫因子的活力, 如糖蛋白、 $\beta$ -1, 3 葡聚糖、脂多糖、肽聚糖可激活螯虾的酚氧化酶原系统<sup>[1~3]</sup>, 细菌可诱导对虾的凝集素活力<sup>[4]</sup>。我们从海水环境中分离得到1株气味黄杆菌(*Flavobacterium odoratum*), 其胞外产物的主要成分为糖蛋白<sup>[5]</sup>, 本文初步研究了该细菌胞外糖蛋白对淡水克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)免疫因子的影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 克氏原螯虾** 从市场购买活力强、个头均匀、体重约20 g个体。实验前于室温条件下暂养,

早晚各投饵1次, 每天进行全量换水。

**1.1.2 大白鼠** 购于青岛海洋药物研究所, 重约500 g。

**1.1.3 气味黄杆菌** 本实验室分离筛选的海洋细菌。

**1.1.4 大肠杆菌 HB101** 抗氨苄青霉素种, 由青岛防疫站提供。

**1.1.5 溶壁微球菌** 由中国科学院海洋研究所提供。

#### 1.2 实验方法

**1.2.1 糖蛋白的制备** 将气味黄杆菌接种到2216E海水液体培养基(0.5%蛋白胨, 0.1%酵母膏, 0.01%磷酸高铁, 陈海水), 120 r/min 摇床培养24 h, 9 000 r/min 冷冻离心30 min, 取上清液经0.22  $\mu$ m滤膜过滤, 滤液经Sephadex G-25除盐, 收集液冷冻干燥制得糖蛋白粗提物。

**1.2.2 螯虾的处理** 用生理盐水配制100 mg/ml的糖蛋白溶液备用。取暂养螯虾设实验组和对照组各50尾, 实验组螯虾于第1、2腹节间注射糖蛋白溶液0.1 ml/尾, 对照组注射等量的生理盐水。注射后每天从螯虾腹节处取血淋巴, 置室温凝固后放置

收稿日期: 1999-08-06

基金项目: 国家“九五”科技攻关资助项目(96-005-03-01-03)

作者简介: 莫照兰(1967~), 女, 现中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室。

4℃待血清析出,然后取螯虾腹节肌肉冰浴匀浆,5 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液,对血清进行凝集素、酚氧化酶、溶菌和抗菌活力的测定,对肌肉上清进行溶菌、抗菌、超氧化物歧化酶活力的测定。

**1.2.3 酚氧化酶(PO)的测定** 参照文献[6]方法进行。PO 活力以实验条件下每分钟 OD<sub>490 nm</sub> 增加 0.001 为 1 个酶活单位。为简单起见,采用控制相同测定条件,直接用 20 min 时的活力单位表示酶活性,即:PO 活力单位=(读数 2-读数 1)×1 000,读数 1 为反应体系初始 OD<sub>490 nm</sub> 值,读数 2 为 20 min 时的 OD<sub>490 nm</sub> 值。

**1.2.4 抗菌(U<sub>a</sub>)和溶菌(U<sub>L</sub>)活力的测定** 参考文献[7]方法进行。以大肠杆菌、溶壁微球菌为底物进行抗菌、溶菌活力测定。将细菌培养到对数生长期,4 000 r/min 冷冻离心 10 min,沉淀,用磷酸缓冲液(pH 6.4)悬浮制备菌悬液(OD<sub>570 nm</sub> 约 0.3)。取血清或肌肉上清 50 μl 与 3 ml 菌悬液混匀,冰浴,以肌肉上清为空白对照测定 570 nm 的初始光密度值(A<sub>0</sub>),然后置 37℃ 水浴 30 min,取出冰浴终止反应,测定反应后的 570 nm 光密度值(A)。抗菌活力和溶菌活力的计算如下:

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

**1.2.5 凝集素活力的测定** 大白鼠颈取血,用 TBS(0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris, 0.02 mol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.05% NaN<sub>3</sub>, pH 7.6)配成 1% 的血细胞悬液。取 50 μl 螯虾血清加到 96 孔板中用 TBS 作二倍系列稀释,然后每孔加入等体积的红细胞悬液,混匀后于 28℃ 孵化 60 min。置显微镜下观察凝集强度,以能凝集大白鼠红细胞的血清最高稀释倍数为

凝集价,为简单起见,以凝集价的对数值表示凝集素活力。

**1.2.6 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定** 采取 Beauchamp<sup>[8]</sup> 的氮蓝四唑(NBT)光还原法进行。反应体系 3 ml,其中含有 5×10<sup>-3</sup> mol/L 磷酸缓冲液(pH=7.8)、13×10<sup>-3</sup> mol/L 蛋氨酸、75×10<sup>-6</sup> mol/L NBT、1×10<sup>-4</sup> mol/L EDTA、2×10<sup>-6</sup> mol/L 核黄素。实验时加入样品制剂 100 μl,日光灯照射 20 min 后测 560 nm 的 OD 值。反应体系加入 100 μl 磷酸缓冲液测得对照 OD 值。SOD 活力按下式求得:

$$\text{SOD 活力单位} = \frac{\text{对照 OD}_{560 \text{ nm}} - \text{样品 OD}_{560 \text{ nm}}}{50\% \text{ 对照 OD}_{560 \text{ nm}}}$$

## 2 结果

### 2.1 螯虾血清凝集效价及 PO 活力

注射后实验组螯虾的血清凝集价在第 1~4 天维持最大,为 64;以后逐渐下降,第 5 天下降到 32;第 11 天以后与对照组趋于一致。对照组螯虾的血清在第 1~2 天也出现较高的凝集活力,为 32;第 3 天以后便慢慢下降并稳定在较低水平(图 1a)。注射生理盐水后螯虾血淋巴凝集活力在第 1~2 天有所提高,但与注射糖蛋白的螯虾相比,活力提高的幅度较小,维持的时间较短。

实验组螯虾血淋巴的 PO 在注射后的第 1~2 天呈上升趋势,最大活力高峰在第 2 天出现,酶活达到 159 单位,此后逐渐下降,第 11 天趋于与对照组一致(图 1b)。实验期间对照组的 PO 活力在 91~102 单位之间波动,数值较恒定,结果表明糖蛋白可增加螯虾血淋巴的凝集素和 PO 活力。

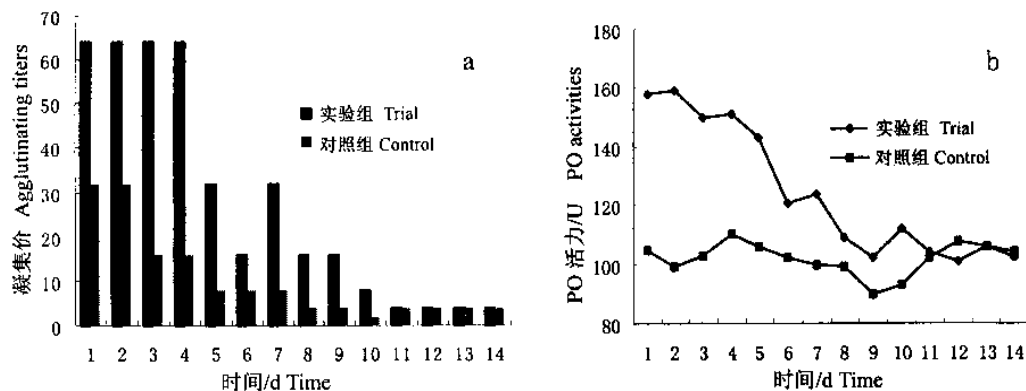


图 1 血淋巴凝集效价及 PO 活力

Fig. 1 Haemagglutinating titers and PO activities of serum

## 2.2 蟹血清的溶菌、抗菌活力

注射后,蟹血清的溶菌活力在第1~3天呈上升趋势,此后逐渐下降,第9天后与对照趋于一致(图2a);抗菌活力则在第1~2天呈上升状态,第6

天时仍维持较高水平,第9天后与对照逐步趋于一致(图2b)。对照组蟹血清的溶菌和抗菌活力稳定地维持较低水平。结果表明糖蛋白可增强蟹血清溶菌和抗菌活力。

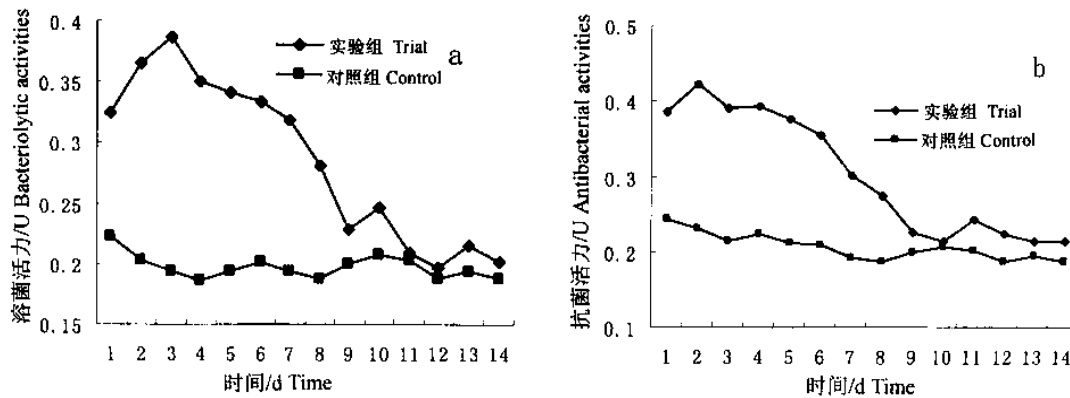


图2 血清溶菌和抗菌活力变化

Fig.2 Bacteriolytic and antibacterial activities of serum

## 2.3 蟹肌肉溶菌、抗菌和SOD活力

注射后,实验组和对照组蟹肌肉上清的溶菌和抗菌活力呈较稳定的变化(图3a, 3b)。与血清相比,蟹肌肉的溶菌、抗菌活力较低。两者的SOD

活力呈相同的变化趋势,在第1~3天内有较高活力,然后均缓慢下降并趋于稳定(图4)。结果表明糖蛋白对蟹肌肉的溶菌、抗菌和SOD活力没有明显影响。

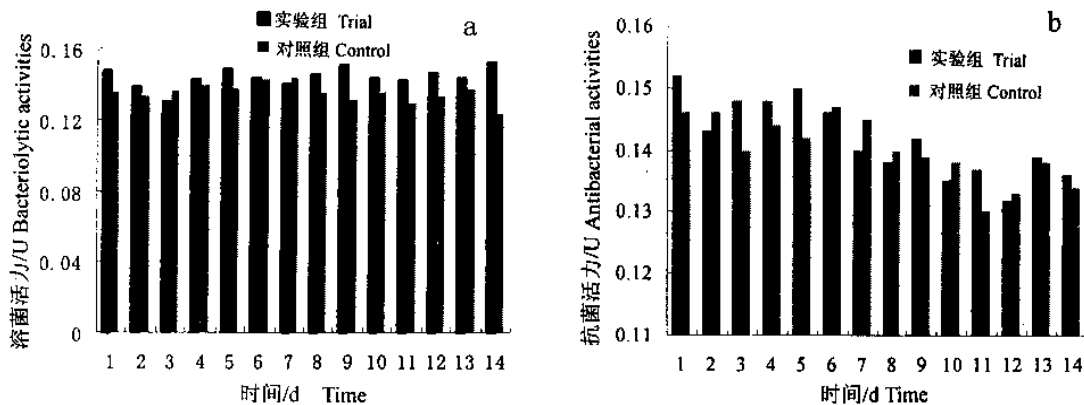


图3 肌肉溶菌和抗菌活力

Fig.3 Bacteriolytic and antibacterial activities of muscle

## 3 讨论

### 3.1 对凝集素活力的影响

甲壳动物的凝集素在免疫反应中作为识别因子可与外来异物结合或覆盖在异物表面,使其失去进一步感染寄主的能力,同时具有调理素的作用,能促进吞噬细胞的识别和吞噬作用,在缺乏特异性免疫系统的甲壳动物中具有重要的意义<sup>[9]</sup>。从实验中可

以看到,蟹体内自然存在着一定活力的凝集素,注射糖蛋白后凝集素活力很快升高,但活力维持的时间不长,这可能与无脊椎动物缺乏特异的识别机制有关。有报道认为通过重复刺激可长时间维持较高的凝集素等免疫因子的活力<sup>[10]</sup>,在我们初步的实验中得到了类似的结果。

### 3.2 对PO活力的影响

酚氧化酶原激活系统(Propo-system)在甲壳动

物中起到识别和防御作用,酚氧化酶原在体外可被某些微生物多糖如脂多糖、肽聚糖、 $\beta$ -1,3-葡聚糖激活,糖蛋白也能激活螯虾的酶氧化酶原系统<sup>[1]</sup>。实验结果表明,气味黄杆菌的胞外糖蛋白可增强螯虾的酚氧化酶活力。另外,本实验发现,高温、去污剂、离子等因子可影响 PO 活力,因此在测定 PO 时要注意低温的条件,使用洁净的器械,以避免酶原非特异性地激活导致实验误差。

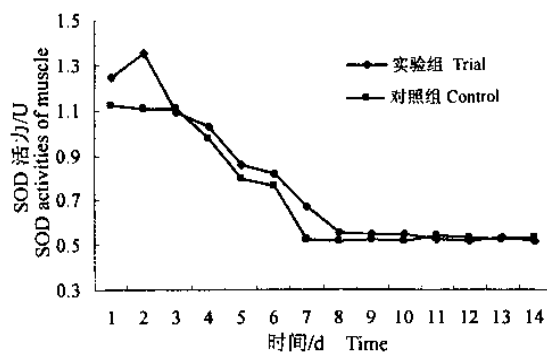


图4 肌肉 SOD 活力

Fig.4 SOD activities of muscle

分析结果发现,注射细菌胞外糖蛋白后的 PO 活力与血清的凝集活力有着相同的变化趋势,可能它们存在一定的协同作用:凝集素作为第一防御因子对入侵的异物进行识别和凝聚,调理血细胞进行吞噬;凝集的异物团和吞噬细胞刺激血细胞 Propo 系统的释放和激活,对异物进行反应,两者的共同作用使机体的防御体系得到增强<sup>[10,11]</sup>。

### 3.3 对溶菌和抗菌活力、SOD 活力的影响

无脊椎动物体内存在一些抗菌物质、溶菌酶类似物,并可被诱导使其活力有不同程度的提高,在防御体系起着绝对重要的作用<sup>[12,13]</sup>。本实验中可观察到螯虾体内存在抗菌和溶菌活性,细菌的胞外糖蛋白可增强血清中的活力,但对肌肉的活力没有明显的影响。从趋势看,血清中的溶菌和抗菌活力比肌肉中的高,表明了螯虾血淋巴是防御反应的首要场所。

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,有研究发现,超氧化物歧化酶活性与生物的免疫水平密切相关<sup>[13]</sup>。本实验没有发现糖蛋白对 SOD 活力有明显影响。细菌的胞外糖蛋白对螯虾机体 SOD 的影响及 SOD 活力是否与螯虾的免疫水平相关,需要进行深入研究。

在目前的许多研究中,利用生物天然或人工合成的化合物免疫促进剂来增强动物的非特异性免疫能力,可代替疫苗或作为佐剂保护脊椎动物抵抗病原菌的侵害。甲壳动物不具备对病原发生反应的特异免疫系统,主要依靠吞噬细胞等细胞因子和 Propo 等体液因子来抵抗病原入侵。本实验目的是为了寻找适合甲壳动物的免疫促进剂,以提高其抗病能力。初步研究认为,细菌的胞外糖蛋白有效地提高了螯虾的一些非特异免疫因子的活力,至于其对螯虾抗病力的影响和机理需要大量深入的研究。

致谢:本研究得到中国水产科学研究院黄海水产研究所黄健研究员及杨冰、王秀华等的指导和帮助,特此感谢。

### 参考文献:

- [1] Soderhall K, Unestam T. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase[J]. Can J Microbiol, 1978, 25:406-414.
- [2] Ashida M, Yamazaki H I. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation[A]. Ohnishi E, Ishizake Ki H. Molting and metamorphosis[C]. Springer Verlag Berlin:Japan Sci Soc Press, 1990.239-263.
- [3] Soderhall K, Hall L. Lipopolysaccharide induced activation of the prophenoloxidase activation system in crayfish haemocyte [J]. Biochem Biophys Acta, 1984, 797:99-104.
- [4] 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.
- [5] 莫照兰. 虾池有益微生物的研究[D]. 青岛海洋大学, 1999.
- [6] Ashida M. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Archives of Biochemistry and biophysics, 1971, 144:749-762.
- [7] 王雷, 李光友, 毛远兴. 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[J]. 海洋与湖泊, 1995, 26(2):179-185.
- [8] Beauchamp C. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44:276-287.
- [9] Renwrtantz L, Stahmer A. Opsonising properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis* [J]. J Comp Physiol, 1983, 141:535-546.
- [10] Bayne C J. Molluscan immunology [A]. Saleuddin ASM, Wilbur K M. Physiology, Part 2. San Diego: Academy Press, 1995. 407-486.
- [11] Yukinori Takahashi, Toshiaki Itami, Masakazu Kondo. Immunodefense system of crustacea[J]. Fish Pathology, 1995, 30(2): 141-150.
- [11] Boman H G. Insect immunity I: Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of immunized pupae[J].

- Insect Immune, 1974, 10:136-140.
- [13] Hultmark D. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pu-

pae of *Hyalophora cecropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7-16.

## Effect of bacterial glycoprotein on immune factors in *Procambarus clarkii*

MO Zhao-lan<sup>1</sup>, LI Hui-rong<sup>1</sup>, YU Yong<sup>1</sup>, WANG Xiang-hong<sup>1</sup>,

JI Wei-shang<sup>1</sup>, XU Huai-shu<sup>1</sup>, P. S. Sudheesh<sup>2</sup>

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. Central Institute of Brackishwater Aquaculture, 141-Marshalls Road, Egmore, India)

**Abstract:** The *Flavobacterium odoratum* extracellular glycoprotein, prepared with sea water culture media and by centrifugalizing, fertilizing and filtrating, was injected into fresh water crayfish *Procambarus clarkii* at the intercoxal region between the first and second abdominal segment. Then, their blood-lymph was taken out every day, and the activities of lectin, phenoloxidase(PO), bacteriolysis and antibacteria in the serum and the bacteriolysis, antibacteria and SOD in the muscle were analysed. The results show that the activities of all the above immune factors in serum in test groups are higher than those in control, with lectin activity maintaining at the maximum level within day 1 to day 4 after the injection, PO activity remaining high within day 1 to day 4 and reaching highest on the second day. SOD, bacteriolysis and antibacterial activities in the muscle between test and control groups have no evident differences. It comes to the conclusion that the glycoprotein of *F. bacterium* is able to stimulate activities of lectin, phenoloxidase, bacteriolytic and antibacterial in blood-lymph of crayfish.

**Key words:** *Flavobacterium odoratum*; glycoprotein; *Procambarus clarkii*; lectin; phenoloxidase; bacteriolysis; antibacteria; superoxidase dismutase

### 欢迎订阅 2001 年《中国渔业经济》杂志

《中国渔业经济》(原《中国渔业经济研究》)是在杂志理事会的领导下,由中国水产科学研究院等单位主办,国内外公开发行的渔业经济学术刊物。在 21 世纪本刊以更高的经济文化底蕴和丰富的内容,为水产界的行政管理、生产经营、科研教学服务,是管理部门、科研部门、技术推广部门、大专学院以及企事业单位从事渔业指导性研究的重要参考读物和宣传媒体。本刊主要探讨有关我国渔业经济发展的方针、政策,进行学术交流。报道深化改革、持续发展等方面的热点、难点、焦点问题,以及国内外渔业经济技术方面的动态与信息。同时也对水产品市场的现状和前景进行分析和预测。设有专题报道、渔业发展战略、经济体制改革、改革之窗、生态经济、资源经济、技术经济、海洋渔业经济、淡水渔业经济、科技成果转化、明星企业,以及市场信息等栏目。本刊还承办各类渔业产品广告和外商来华广告,欢迎中外企业惠顾。

本刊为双月刊,16 开本,彩封。每期定价 4.00 元,全年收费 24.00 元。邮局发行代号:18-157。各地邮局均可订阅,如需向本编辑部直接订阅者请向编辑部索取订单。书款通过银行或邮局汇至本刊编辑部。开户银行:北京工商银行永定路分理处;帐号:144428-29;收款单位:中国水产科学研究院。

编辑部地址:北京市丰台区永定路南口青塔村 150 号《中国渔业经济》编辑部

邮政编码:100039 联系电话:(010)68673921 联系人:冯庚菲