

## 对虾非特异性免疫与对虾疾病监控的研究进展\*

## RESEARCHING PROGRESSES IN SHRIMP NON-SPECIFIC IMMUNITY AND DISEASE CONTROL

樊廷俊

(青岛海洋大学海洋生命学院海洋生物学系 266003)

在全球范围内,对虾水产养殖业的发展及其养殖能力所面临的最大危险是日益严重的生态环境和病理问题。其中,疾病是一个在世界范围内限制对虾养殖业发展的主要因素。在过去的几年中,对虾疾病造成的损失高达数百万美元,迫使人们开始研究其发病原因、寻找诊断、控制和阻止它们的方法。要监控对虾的健康状态和防御能力并筛选出提高对虾免疫力的物质,最终解决疾病问题,研究对虾的病理学和防御系统已是当务之急。而对虾免疫学的研究则是探讨对虾养殖业疾病控制策略的关键要素之一;此外,对对虾免疫学和遗传学特征的同步研究,又是对对虾养殖中进行抗病动物筛选的先决条件。常规免疫检测技术的建立,不仅能检测对虾的免疫缺陷性疾病,而且也将对环境质量的控制和改善具有重要的指导意义。因此,筛选并鉴定出影响对虾免疫性能与免疫反应的各种因子也必将具有重要意义。正因为如此,对虾养殖业中疾病的防止和控制已引起绝大多数对虾生产国的高度重视。

无脊椎动物的免疫反应比较原始,缺乏真正意义上的抗体,因此没有免疫记忆能力,它们只能依靠先天性的免疫反应来抵御寄生虫和疾病,血细胞构成了抵御侵略者的第一道防线,在对虾的防御反应中起着决定性的作用。其中,伤口的速效愈合便是一种重要的先天性初期免疫反应,在马蹄蟹和甲壳纲动物中重点对这种反应进行了研究。在甲壳纲动物中,该凝集反应是由一个转谷氨酰胺酶和一个凝血蛋白来完成的。这些动物在体腔中利用细胞和体液防御反应来保护自身免受寄生虫的侵染,其中的体液反应主要靠凝集素来结合外来粒子(如细菌或真菌类)以便除去和杀死这些外来有机体。在对虾中,被称为酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)的活性系统直接参与了非己识别。最近,在对虾中还鉴定出了特异性的抗菌肽。目前,关于甲壳纲动物免疫因子的结构和功能的信息越来越多,很可能所涉及的免疫反应或至少免疫因子在不同种之间是非常相似的。位于种间和位于原口动物

和后口动物之间的一些相类似的例子已被查清,如防卫素、 $\alpha$ -巨球蛋白、过氧化物酶、铁蛋白、转铁蛋白、铁调节蛋白和许多其他蛋白。例如最近对后口动物的一项研究结果非常有趣,发现在这类无脊椎动物中也存在有C3样分子和甘露聚糖-结合关联蛋白酶,表明后口动物中至少含有部分补体系统。

目前,对对虾非特异性免疫与对虾疾病监控的研究主要集中在3个方面。

## 1 对虾的免疫因子

无脊椎动物缺乏真正的抗体,其免疫反应比较原始,只能依靠先天性的免疫反应来抵御寄生虫和疾病。其中,凝集素、 $\beta$ -葡聚糖结合蛋白和酚氧化酶等免疫因子直接参与了对虾的非己识别。

## 1.1 凝集素

Sequeira T. 在圣保罗对虾(*Penaeus paulensis*)和南方白对虾(*Penaeus schmitt*)中,通过研究其血细胞的系列凝集活性,发现其对兔子和小鼠的红血细胞也具有极高的滴度,但对马红血细胞却具有不同的凝集活性。N-乙酰神经氨酸为其最佳抑制剂,假单胞杆菌属的脂多糖(LPS)对它也具有部分抑制作用。

Vazquez L. 等1997年发现,罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)循环血细胞的吞噬活性是由一小群颗粒血细胞介导的。这些细胞对非己细胞的识别似乎是由2个独立的机制来介导的:靠识别细胞的O-乙酰唾液酸和N-乙酰糖的一个特异性机制和一个非特异性机制。两个机制的活性发挥均需要不同的最适温度和时间。具有吞噬活性的血细胞可与抗血清凝集素的免疫IgG发生反应。对细胞裂解物进行了免疫电转移沉淀分析发现,有2种68~72 kDa大小的主要蛋白质。在电镜下还显示出了凝集素在血细胞质膜上的规则分

\* 高等学校骨干教师资助计划资助。

第一作者:樊廷俊,出生于1964年,博士,副教授。研究方向:海洋动物细胞工程。E-mail: tjfan@ouqd.edu.cn

收稿日期:2000-09-06;修回日期:2001-02-22

## 研究综述

布。所有结果均表明有一种膜凝集素参与了非己识别。现已从淡水小龙虾中纯化和克隆出了凝集蛋白,发现它是属于卵黄蛋白原大家族中的一种蛋白,且已用电镜对其凝集机制进行了研究。

Yeh M. S. 等<sup>[13]</sup>利用 DEAE 阴离子交换柱层析,从斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的血淋巴中纯化出了凝集蛋白。在  $\text{Ca}^{2+}$  和转谷氨酰胺酶存在时,该蛋白质在血细胞裂解物中可形成稳定的凝块。在高达 66 °C 时仍具有稳定性。经 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF 质量光度计测定,该凝集蛋白的分子量为 380 kDa,且蛋白质的存在形式为由二硫键连接而成的同源二聚体和寡聚体。该凝集蛋白在大小和氨基酸组成上与其他对虾、龙虾和喇蛄等的具有相似性,且在 N-端氨基酸序列上有 60%~80% 的同源性。对凝集蛋白进行单糖分析表明,在该糖蛋白约 5% 的糖组分中,含有甘露糖、葡萄糖胺或 N-端乙酰葡萄糖胺,可能还含有葡萄糖。但用 oil red O 法对电泳样品进行染色,在蛋白质中未检测出脂成分。在免疫扩散和免疫沉淀中,抗凝集蛋白的抗体仅仅与对虾的凝集蛋白发生反应,而不与其他甲壳纲动物的反应。Fragkiadakis G. A. <sup>[13]</sup>从甲壳纲的动物的血淋巴中也分离出了特异性的凝集素,发现血淋巴在 22~28 °C 时 3 h 便可发生凝集反应,而在 5 °C 时 24 h 才能形成凝块。

### 1.2 $\beta$ -葡聚糖结合蛋白

Vargas-Albores F. 等 1997 年在南美白对虾和红额角对虾 (*Penaeus stylirostris*) 血细胞的细胞质中已鉴定出了  $\beta$ -葡聚糖结合蛋白(BGBP)。利用海带多糖的亲合层析已纯化出南美白对虾的 BGBP,并对其分子和生物学属性进行了研究。发现该 BGBP 为 100 kDa 的单体蛋白,与其他甲壳类的 BGBP 非常相似。用小龙虾 (*Pacifastacus leniusculus*) 和加州对虾 (*Penaeus californiensis*) BGBP 的抗血清也检测出了南美白对虾和红额角对虾的 BGBP。发现其氨基酸组成和 N-端氨基酸序列与加州对虾及小龙虾的 BGBP 均非常相似,表明这种识别蛋白可能普遍存在于淡水和海洋甲壳动物中。

Yepiz-Plascencia G. 等<sup>[14]</sup>在海生对虾的血淋巴中,也发现了一种高密度脂蛋白(HDL)和一种 BGBP,两种蛋白在颜色和分子量方面具有相似性,它们分别参与了脂类运输和对外来物的识别。利用密度梯度离心与海带多糖的亲合层析方法,在南美白对虾和加州对虾中纯化出了 HDL 和 BGBP,其在两种虾中均为分子量约 100~112 kDa 的单体糖蛋白,其中的共价结合寡糖链可为凝集素 Con A 和麦胚凝集素所识别。两种虾的 HDL 也具有高度相似的氨基酸组成和 N-端气基

酸序列,它们均含有脂类,因此其密度比对虾的绝大多数血浆蛋白要低,从而使之能为密度梯度超离心所纯化。南美白对虾的 HDL 密度为 1.12~1.14 g/ml,而加州对虾中 HDL 的平均密度为 1.139 g/ml。利用南美白对虾的 HDL 和加州对虾的 BGBP 的多克隆抗体(抗-HDL 和抗-BGBP)进行 Western 杂交表明,两种抗体对南美白对虾的 HDL 和 BGBP 以及加州对虾的 HDL 和 BGBP 4 种蛋白质均具有识别能力。南美白对虾和 *P. leniusculus* 虾 HDL 和 BGBP 的 N-端氨基酸序列是完全相同的(南美白对虾: DAGQASLAGNFNSLR; *P. leniusculus*: DAGEASLVTFNSAKLHLKTPFARA)。所有结果均表明,对虾血淋巴等所含有的 BGBP 和 HDL 很可能是同种蛋白。Johansson M. W. <sup>[6]</sup>认为 BGBP 等是无脊椎动物中一类非常重要的细胞粘分子。

### 1.3 酚氧化酶

酚氧化酶是在动物、植物和真菌中广泛分布的一种含铜蛋白酶,对起始黑色素的生物合成具有重要作用。甲壳纲动物中酚氧化酶原的激活在宿主防御中具有重要作用。但是,目前对酚氧化酶原激活系统的分子机制还不太清楚。

Perazzolo L. M. 等 1997 年在研究圣保罗对虾酚氧化酶原的免疫激活体系及其在免疫系统中的作用时,发现 90% 以上的酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性存在于对虾的血细胞中。微生物细胞壁的组分如 LPS 和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖可大幅度提高该酶的活性,表明该酶参与了非己识别。另外,在对虾血清和胰蛋白酶降解液中也发现了酚氧化酶活性,且 LPS 能增加该酶的活性。鉴于血清比血细胞裂解液更容易获得,因此血清可被用作研究对虾酚氧化酶原激活体系的一个指标。酚氧化酶活性具有阳离子依赖性,且 5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  和 10 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  是该酶活性的最适浓度。Sung H. H. 等<sup>[11]</sup>在对虾血细胞裂解液中还发现了一种免疫因子,能诱导对虾血细胞的细胞粘着和脱颗粒化。

Gollas-Galvan T. 等<sup>[15]</sup>利用亲合层析和超离心技术,从加州对虾的血细胞中纯化出了酚氧化酶原。经 SDS-PAGE 鉴定,酚氧化酶原为 114 kDa 的单体蛋白,被酶解后可产生一个 107 kDa 的有活性的酚氧化酶。两种形式的蛋白的等电点均为 7.35。酚氧化酶对 L-多巴底物的最适反应 pH 值为 8.0,受叠氮钠、硫脲和 EDTA 轻微抑制,为 DTCA 和 Cu 所强烈抑制。其底物亲合性和抑制特性表明,这种酚氧化酶为一种酪氨酸蛋白酶。纯化的酚氧化酶原不能为微生物的细胞壁复合物(LPS 或  $\beta$ -葡聚糖)所激活。编码斑节对虾酚氧化酶原的 cDNA 已被克隆和测序。3002 bp 的 cDNA 中含有一个 2121 bp 的开读框和一个 881 bp 的 3'-端非翻

## 研究综述

译区。其分子量为 79kDa, pI 约为 5.8, 存在有 2 个 Cu 结合部位, 在节肢动物的酚氧化酶原中高度保守。酶原激活的裂解部位位于 Arg 44 和 Val 45 之间。还存在一个暂时的补体样结构区 GCGWPQHM。Northern 分析发现, 酚氧化酶原是在血细胞而不是在肝胰腺中合成的。至今所克隆的 10 种酚氧化酶原中, 对虾酚氧化酶原与小龙虾的酚氧化酶原非常相似。

Sritunyalucksana K. 等<sup>[9]</sup>通过用各种因子对斑节对虾和罗氏沼虾的血细胞裂解液进行处理, 研究了其酚氧化酶的活性变化。其所用处理因子包括温度(由 25 增加至 70℃)、4 种诱导因子( $\beta$ -1, 3-1, 6-葡聚糖、酵母聚糖、热灭活弧菌细胞和 LPS)、胰蛋白酶、3 种蛋白酶抑制剂(SBTI、*p*-nitrophenyl-*p'*-guanidinobenzoate 与 benzamidin)和二价阳离子( $Mg^{2+}$  或  $Ca^{2+}$ ), 发现在 37℃ 时, 两种动物中酚氧化酶的诱导活性最强, 此外, 其酶活性也因血细胞裂解液(HLS)样品中诱导因子或阳离子的浓度不同而不同。其最适浓度分别为: LPS, 0.5 mg/ml;  $\beta$ -葡聚糖和酵母聚糖, 1 mg/ml; 弧菌细胞,  $10^6$  细胞/ml。另外, 用胰蛋白酶处理罗氏沼虾的 HLS 时, 酚氧化酶活性增加; 而用 3 种蛋白酶抑制剂处理时活性则降低。但是, 不论是胰蛋白酶还是蛋白酶抑制剂对斑节对虾均没有作用。用 20 mmol/L  $Ca^{2+}$  或  $Mg^{2+}$  处理后, HLS 中的酚氧化酶活性最强, 且二种阳离子的同时添加还可使该酶的活性增加。而用 EDTA 处理后, 该酶的活性降低。细胞化学分析表明, 该酚氧化酶原体系存在于斑节对虾和罗氏沼虾的颗粒血细胞中。

Nagai T. 等<sup>[7]</sup>还发现, 在宿主防御中, 血凝系统和酚氧化酶原激活系统可能起源于一个共同的祖先蛋白酶链, 从而确定了血凝和酚氧化酶原激活之间的内在联系。Sugumar M. 等<sup>[10]</sup>又提出了酚氧化酶活性控制的一个新机制, 认为酰异构酶通过与酚氧化酶形成复合物对酚氧化酶的活性具有抑制作用。

### 1.4 对虾素

Destournieux D. 等 1997 年从实验诱导免疫应答的南美白对虾血淋巴中分离出了抗菌肽新家族中的 3 个成员。3 个分子对真菌和细菌具有抗菌活性, 尤其是对革兰氏阳性菌的活性更为显著。通过酶解、Edman 降解、质量光度计和血细胞 cDNA 文库的 cDNA 克隆多种方法并用, 确定了这些肽的全部序列。经鉴定, 成熟分子(50 和 62 个残基)的 N-端结构区富含脯氨酸残基, 而 C-端区含有 3 个分子内二硫键, 其中的 1 个分子在第一个位置上经翻译后修饰加上了一个焦谷氨酸。比较 cDNA 克隆和质量光度计的数据, 发现其中 2 个肽可能因切除了甘氨酸残基而使羧基端发生酰胺化。这些分子与迄今发现的其他抗菌肽没有明显的同源性,

因而被命名为对虾素(penaecidin)。对虾素表现有抗真菌和抗细菌活性, 尤其是抗革兰氏阳性菌, 具有细菌凝集活性。利用合成 DNA 探针和抗其 N-端序列的特异性抗血清, 对对虾素在南美白对虾中的表达部位也进行了研究。Northern 点杂交显示, 其 mRNA 在血细胞中强烈表达, 而在心脏、淋巴器官、生殖腺和眼中只有轻微的表达, 但是在肝胰腺和小肠中不表达。发现对虾素 mRNA 的表达水平有个体差异。免疫标记实验表明, 其定位分布在颗粒和半颗粒细胞中。

在南美白对虾对细菌刺激反应时, 研究了对虾素的表达调控。对从注射死细菌(微球菌、大肠杆菌 D31)刺激后的虾中提取的血细胞 RNA 进行 Northern 点杂交, 发现在注射 3 或 6 h 后对虾素的表达有一个减少。注射细菌 24 h 后才恢复到正常虾的表达水平。在刺激 3 h 后, 利用 ELISA 方法对血细胞的去颗粒过程以及血液循环中对虾素的释放进行了研究。为了更好地鉴定在细菌刺激下对虾素的合成和表达调控的机制, 必须考虑到有关产生对虾素的血细胞群体的血相成分的进化。在其他虾如红额角对虾、日本对虾(*Penaeus japonicus*), 以及在其他甲壳类的十足类中对对虾素的存在也进行了研究。

在红额角对虾中, 对肌肉内注射或热激活或存活的病原性对虾弧菌(*Vibrio penaeicida*)的虾的抗菌肽进行了分离。在注射 0, 6, 12, 24 和 48h 后分别收集虾的血淋巴, 对血浆和血细胞细胞器的不同样品用逆向层析法进行了分析。对不同时间的样品的层析数据进行比较, 以鉴定在细菌刺激下虾的不同表达。对收集的层析组分的抗菌活性进行了分析, 发现 25% 乙腈的洗脱组分对对虾的细丝状真菌病原-镰刀菌尖孢霉素(*Fusarium oxysporum*)具有活性, 而没有抗菌活性。目前, 正在进行同源性多肽的纯化及其鉴定工作。

## 2 对虾的血细胞

要解决养殖业中对虾的感染性疾病问题, 研究其病理学和防御系统已是当务之急。由于血细胞构成了抵御侵略者的第一道防线, 且在甲壳纲动物的防御反应中起着决定性的作用, 要监控对虾的健康状态和防御能力, 以及筛选使对虾对感染因素具有更强抵抗力的方法, 因此必须重点研究对虾的血细胞。

目前, 已对斑节对虾的血细胞参数进行了集中研究。Aono H. 等于 1994 年对几种甲壳动物中血清和胞浆诱导的血细胞裂解进行了研究。在体外短期的培养体系中, 他们观察了多刺龙虾(*Panulirus japonicus*)、日本对虾和龙虾(*Homarus americanus*) 3 种甲壳动物的血清和/或胞浆对同源和异源血细胞的细胞学形态的影

## 研究综述

响。从血淋巴分离的多刺龙虾血细胞,当与同种的血清混合时,透明状和半颗粒状血细胞发生了快速细胞裂解。多刺龙虾的胞浆透析物对透明状和半颗粒状血细胞同样具有细胞裂解作用。尽管颗粒状血细胞不被裂解,但当暴露在血清和胞浆时也会发生形态和行为(粘着与扩展)变化。日本对虾和龙虾(*Homarus americanus*)的胞浆透析物对同种的血细胞也表现出相同的作用。这3种动物的胞浆透析物对异源血细胞的细胞裂解作用不明显。热处理后,胞浆透析物的细胞裂解活性将降低,而蛋白酶处理后则失去活性。这些结果表明,在甲壳动物的胞浆中存在有一种能诱导透明状和半颗粒状血细胞裂解的蛋白质因子。

Song Y. L. 等 1994 年研究发现,对斑节对虾的血细胞进行免疫刺激,能使其产生抗菌物质。Chisholm J. R. 等 1995 年对龙虾(*Galathea strigosa*)、挪威龙虾(*Nephrops norvegicus*)、对虾(*Crangon crangon*)和南极大等足类动物(*Glyptonotus antarcticus*)血细胞的体外抗菌活性进行了研究。对上述各个物种,以海洋细菌(*Psychrobacter immobilis*)作为实验微生物,尽管也用了革兰氏阳性菌(*G. antarcticus*和*Planococcus citreus*)和 BS68(南极水的分离物)。来自所有4种动物的血细胞裂解液(HLS)在4h后均能减少试验细菌的数量,表明它们的血细胞含有能在体外中和细菌的因子。但是,对龙虾、挪威龙虾和对虾(*C. crangon*)血细胞裂解液的连续稀释样品所产生的应答进行比较,发现其每单位蛋白的活性要比 *Carcinus maenas* 弱。另外,使用等足类动物,对 *Planococcus citreus* 菌和 BS68 也具有阳性活性;在 0℃和 20℃对所有细菌均能进行有效反应。所有这些结果表明:(1)许多甲壳动物的血细胞均含有能在体外中和细菌的因子;(2)抗菌的潜能随物种的不同而有种间差异;(3)至少在1种极地无脊椎动物其抗菌免疫在低温下仍起作用。

1995年,Rodriguez J. 等便利用单克隆抗体对对虾细胞和血浆成分进行了鉴定。到了1996年,Sequeira T. 等利用流式细胞仪对血细胞的DNA进行定量测定,测出了日本对虾在细胞周期S和G<sup>2</sup>M期的循环血细胞百分数。在一次或两次抗原刺激之前和之后,分别对外周血中血细胞的增殖速率(HPR)进行了测定。发现:(a)一次性注射羊红细胞(SRBC)、白色念珠菌(*Candida albicans*)的酵母颗粒(Cp)或大分生孢子的镰刀菌素(Fs)后,HPR增加;(b)在用这些抗原进行交叉刺激后,HPR有适量或不太明显的增加;(c)当用Cp进行两次刺激时,对虾的HPR反应有一个明显的二次增加,用Fs刺激时程度有所降低,而用SRBC刺激时无增加。在对Cp的反应中,HPR的二次增

加伴随有血细胞对TNF-α的高度表达。从非刺激对虾、Cp初次刺激对虾到Cp再次刺激对虾,在电镜下已观察到其血细胞超微结构的差别,包括血细胞细胞质颗粒的大小、核仁结构和内质网池的数量等,此结构差别反映了细胞的不同激活程度。经观察发现,与圣保罗对虾血淋巴一起培养的大量微生物被颗粒血细胞所吞噬,进一步支持了对虾的先天性免疫反应可以被修饰的假定。电镜观察表明,在研究的两种plasmoidea和一种对虾中,不同的透明和颗粒状外周血细胞代表的是不同的细胞谱系。

Sequeira T. 等还发现,在用LPS,p43(白色念珠菌产生的能促进淋巴细胞分裂的一种免疫抑制蛋白质)及LPS与p43联合刺激后,增生血细胞的百分比大量增加(约3倍)。另外还发现,Fusarium opp感染的对虾中其增生血细胞的百分比比未感染虾约增高6倍。此外,LPS刺激后的对虾,其循环血细胞对<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶的摄取量要比非刺激对虾大26倍。该研究表明,日本对虾的循环血细胞在体内具有分裂能力,而且促有丝分裂剂或感染刺激还可使其大量增生。

Gargioni R. 等<sup>[1]</sup>等利用光镜、电镜和流式细胞仪方法从形态上将圣保罗对虾的血细胞区分为三类——透明血细胞(HH)、半颗粒血细胞(SGH)和颗粒血细胞(LGH)。使用所研制的可与血细胞质膜或胞质或两者的抗原决定簇反应的8种单克隆抗体,已能将血细胞的抗原性区分开来;而且还研究了血细胞的功能(如吞噬、趋化、溶酶体酶活性等)以及造血组织中血细胞的发生等。注射不同类型的外来物如细菌或LPS可增强血细胞的功能。在实验室中这类方法可用来研究对虾防御系统的功能,并可用来评估对虾的健康状态。这些处理能否导致对虾对病原的有效防御,还需要利用不同类型的外源物和免疫促进剂进行大规模实验。

Anggraeni M. S. 等<sup>[2]</sup>最近发现,斑节对虾的血细胞来源于类淋巴器官的球形细胞。

### 3 对虾免疫反应的评价及健康控制

#### 3.1 养殖对虾的健康标准和免疫参数

目前,已建立和优化了对红额角对虾、南美白对虾、斑节对虾和圣保罗对虾中免疫效应物进行评估的定量分析方法。Gilles L. M. 等<sup>[3]</sup>利用特异性抗体进行

① Gilles Le Moullac, Denis Saulnier. Establishment of health criteria in reared penaeid shrimp and analysis of immune parameters under stress conditions. Abstracts of INCO Shrimp Workshop. Thailand, 1999. P9

## 研究综述

免疫酶分析,对血细胞计数、酚氧化酶、呼吸突发和血浆凝集活性的总水平和差别水平,以及血浆的抗菌活性和一些血浆蛋白如凝血因子(一种凝集素)和一个 $\alpha$ -巨球蛋白进行了定量分析。在蜕皮间期(C蜕皮阶段)的健康对虾中获得了测定的免疫参数。结果表明,上述对虾的血淋巴中血细胞的总数(THC)相似,为 $2 \times 10^7$ 细胞/ml,只有圣保罗对虾例外,为 $5 \times 10^7$ 细胞/ml。

在控制的环境条件下,对对虾的免疫反应进行了评价。发现当温度和水中 $O_2$ 降低或当氨的水平增加时,血细胞数和呼吸爆发较低。对盐分的影响也进行了估测,发现当盐分减少时,THC也减少。此外,还分析了杀菌剂 Propiconazole 对农业的影响及其在虾池中的残余污染。发现这种杀菌剂对注射不同浓度( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$ 和  $1 \times 10^7$ )的虾的免疫反应有干扰作用,能影响血相、呼吸爆发、血浆蛋白质浓度和抗菌活性。初步结果显示,食物中蛋白质的水平和据血细胞总数和血浆蛋白水平来评测的免疫特性之间有一定的相关性,要更好地理解食物蛋白和血细胞形成(造血)之间的关系还需要进一步的实验。通过测试,发现日常饮食中所添加的商业免疫刺激剂复合物对养殖对虾的免疫特性具有修饰作用。

在高度感染对虾弧菌实验之前,对加州对虾的免疫参数进行了评估。存活虾比死虾具有非常高的 THC 和酚氧化酶活性。这些结果表明,高免疫性的对虾比低免疫性对虾对弧菌具有更强的抵抗力。有几种因素似乎能影响虾的免疫反应,为了更好地理解增加养殖虾群免疫状态的方法,仍需要进一步的研究。

### 3.2 养殖对虾的疾病控制

在过去的几年中,对虾疾病造成的损失高达数百万美元,迫使人们开始研究其发病原因、诊断,以及寻找开发控制和阻止它们的方法。许多这类方法已经并继续被开发,但从养殖场水平上来看在大多数情况下还是非常缓慢的。如何将对虾健康管理和疾病控制新进展转化成商用养殖场的现实仍然是摆在养殖者面前的最大挑战之一。鉴于多种原因,现有知识的运用远远落后于现有的潜在能力。有些是由养殖场方面的原因造成的。养殖场之间的规模差别、养殖者理解能力的不同、自然压力的影响、以及对实验室或小规模实验区所开发出的方法和范围的适应需求,均需要大量的创造性、实用性且有时是运气。此外,各对虾养殖国家内还存在着有关技术转让和发展体系的不完善。

传染病是对虾水产养殖中的一个最具有破坏性的问题。经鉴定,最具危害性的病原主要是病毒、原核

生物和原生动植物。使用生物工程手段来管理和控制对虾疾病应是最佳途径。目前,养殖对虾的疾病控制主要有如下4种途径:

#### 3.2.1 抗病新品种的培育

首先是使用遗传转化的特定病原抗性株。抗病转基因动物已经开发成功,但是这类研究对软体动物和对虾来说才刚刚开始。适用于软体动物和对虾胚胎的转染方法已经研制成功,已有异源启动子在调控报告基因表达中的效率的初步数据。其他转化体系也显示出潜力,包括转移基因和 densoviruses。

#### 3.2.2 改善对虾的抗病能力

在利用免疫促进剂对对虾进行免疫刺激的早期研究中,多利用注射或浸泡方法。但口服给药却更适用于水产业。Karunasagar I. 等 1992 年通过口服细菌素和酵母 1, 3-葡聚糖对斑节对虾抗病能力的改善情况进行了研究。通过分析血淋巴和血细胞裂解物的抗弧菌活性、HLS 中的多酚氧化酶活性以及血细胞中反应氧种类(ROS)的产生情况,对免疫反应进行了评价。结果显示,在血淋巴(血浆)与 HLS 的诱导下,抗弧菌活性在口服给药 48 h 后达到最高峰。当联合使用细菌素和酵母葡聚糖时,抑制率可高达 90% 以上。另外,对于 ROS 的产生,联合使用细菌素和葡聚糖时也有协同效应。峰值活性在 48h。口服这些免疫促进剂能增加 HLS 中的多酚氧化酶活性,增强了对虾的免疫活性,进而提高对虾的抗病能力。用 SDS-PAGE 对处理和未处理对虾的血淋巴蛋白进行分析表明,免疫促进剂处理后诱导产生了某些蛋白质。

菌核酸是从卫矛科(Glyptopetalum sclerocarpum Laws)茎皮中分离出的一种新的带有碳骨架的倍半萜(sesquiterpene)。该复合物对 1 和 2 型单纯疱疹病毒具有抗毒活性,对革兰氏阳性菌和一种真菌具有抗菌活性<sup>[8]</sup>。还有几种物质也能影响对虾的免疫反应<sup>[12]</sup>,见表 1。

#### 3.2.3 分子诊断技术

利用分子探针可以研制病原的检测、鉴定和诊断技术,从而使疾病的预防成为可能。现在已经制备出了软体动物主要病原的分子探针,但对虾病原的却只有少数几个。目前,所制备的单克隆抗体已被用于病原的免疫诊断中,如常用的免疫荧光检测技术、酶联免疫吸附实验(ELISA)等。这类诊断方法对水产养殖来说虽然较新,但却具有巨大的开发潜力。

#### 3.2.4 细胞工程技术

世界范围的对虾病毒病的爆发,使对病毒病的研究迫在眉睫。而建立细胞系可用于对病毒病的分离,是研究病毒的生理生化特性、感染机制、病毒检测及

## 研究综述

表 1 能影响对虾免疫反应的几种物质

物质	作用
菌核酸	抗 I, II 型单纯疱疹病毒; 抗革兰氏阳性菌和一种真菌
脱乙酰壳多糖	抗 <i>Escherichia coli</i>
对虾素	抗革兰氏阳性菌
膜凝集素	参与非己识别
血细胞裂解液	参与对细菌的粘着及中和
LPS	提高对虾免疫能力(增加酚氧化酶活性)
$\beta$ -1, 3-葡聚糖	提高对虾免疫能力(增加酚氧化酶活性)

病毒防治等的重要手段; 同时, 对虾连续性细胞系可以应用于细胞生物学、遗传学、细胞工程等诸多研究领域<sup>[1]</sup>。

### 主要参考文献

- 樊廷俊、汪 岷、张士瑾. 海洋生物技术新进展. 北京: 海洋出版社. 2000. 89~100
- Anggraeni M.S., Owens L.. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*, *Dis. Aquat. Organ.*, 2000, **40**(2): 85~92
- Fragkiadakis G.A.. Isolation of lectins from hemolymph of decapod crustaceans by adsorption on formalinized erythrocytes, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2000, **44**(1-2): 109~114
- Gargioni R., Barracco M.A.. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*, *J. Morphol.*, 1998, **236**(3): 209~221
- Gollas-Galvan T., Hernandez-Lopez J., Vargas-Albores F.. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 1999, **122**(1): 77~82
- Johansson M.W.. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity, *Dev. Comp. Immunol.*, 1999, **23**(45): 303~315
- Nagai T., Kawabata Si. A.. Link between blood coagulation and prophenoloxidase activation in arthropod host defense, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(38): 29 264~29 267
- Sotanaphun U., Lipipun V., Suttisri R. *et al.*. A new antiviral and antimicrobial sesquiterpene from *Glyptopetalum sclerocarum*, *Planta Med.*, 1999, **65**(3): 257~258
- Sritunyalucksana K., Cerenius L., Soderhall K.. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, *Dev. Comp. Immunol.*, 1999, **23**(3): 179~186
- Sugumaran M., Nellaippan K., Valivitan K.A.. New

mechanism for the control of phenoloxidase activity: inhibition and complex formation with quinone isomerase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **379**(2): 252~260

- Sung H.H., Chang H.J., Her C.H. *et al.*. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*, *J. Invertebr. Pathol.*, 1998, **71**(1): 26~33
- Tsai G.J., Su W.H.. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*, *J. Food Prot.*, 1999, **62**(3): 239~243
- Yeh M.S., Chen Y.L., Tsai I.H.. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 1998, **121**(2): 169~176
- Yepiz-Plascencia G., Vargas-Albores F., Jimenez-Vega F. *et al.*. Shrimp plasma HDL and beta-glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 1998, **121**(3): 309~314

### 辅助参考文献

- Destoumieux D., Bulet P., Loew D. *et al.*. A new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda), *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**(45): 28 398~28 406
- Karunasagar I., Ali A., Otta S.K. *et al.*. Immunization with bacterial antigens: infections with motile aeromonads, *Dev. Biol. Stand.*, 1997, **90**: 135~141
- Perazzolo L.M., Barracco M.A.. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors, *Dev. Comp. Immunol.*, 1997, **21**(5): 385~395
- Sequeira T., Tavares D., Arala-Chaves M.. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*, *Dev. Comp. Immunol.*, 1996, **20**(2): 97~104
- Vargas-Albores F., Jimenez-Vega F., Yepiz-Plascencia G.M.. Purification and comparison of beta-1, 3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*), *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 1997, **116**(4): 453~458
- Vazquez L., Maldonado G., Agundis C. *et al.*. Participation of a sialic acid-specific lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self cells, *J. Exp. Zool.*, 1997, **279**(3): 265~272 (本文编辑: 刘珊珊)