

School Code: 10270

Registration Number: 082200905



Shanghai Normal University

Master Thesis

Effects of Yeast Cell-wall Polysaccharides on Several Immune
Related Isoenzymes in *Macrobrachium rosenbergii*

Department College of Life and Environment Science

Degree Zoology

Specialty Cellular and Molecular Biology

Name WANG Fang

Supervisor Prof. XU Yan

Classification Number Q95

Date April, 2011

论文题目: 酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响

学科专业: 动物学

学位申请人: 王芳

指导教师: 许燕 副教授

摘 要

我国在水产产业中占据着举足轻重的作用, 就 2003 年的海水养殖虾总产量就已达到了全球总量的 31%。但由于集约化养殖的发展, 养殖规模的盲目扩大和养殖水域的过度开发, 破坏了水体生态平衡, 引起病原菌的大量繁殖给我国养殖业带来了巨大的经济损失。因此采取何种有效的方法来预防控制这些疾病已成为热点问题。近几年来免疫多糖类免疫促进剂的研究及应用备受学者们的关注, 而酵母细胞壁多糖已经被证明是一种良好的免疫促进剂, 它不仅能够加快虾蟹免疫器官的发育, 又能激发机体非特异性免疫反应。因此关于酵母细胞壁多糖在水产养殖实际应用中的给药方法、适宜使用量及处理时间都是目前研究的热点。本研究课题采用浸浴和注射两种给药方法, 分析比较酵母细胞壁多糖在不同浓度和不同时间对罗氏沼虾体内心脏、肝脏、鳃和肌肉 4 种组织中酸性磷酸酶(ACP)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)和超氧化物歧化酶(SOD)等 4 种免疫相关同工酶的作用, 以进一步探讨这种免疫促进剂对罗氏沼虾体内免疫系统的作用机理, 并为酵母细胞壁多糖在虾类等水产养殖生产实践中的应用提供参考。

1、不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响

将酵母细胞壁多糖配制成 0.00mg/L、31.25 mg/L、62.50mg/L、125.00mg/L 和 250.00mg/L 5 个浓度, 对罗氏沼虾进行浸浴处理 120h 后, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳方法及酶活力测定方法来探讨酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾心脏、肝脏、鳃和肌肉 4 种组织中几种免疫相关同工酶(酸性磷酸酶(ACP), 过氧化物酶(POD), 多酚氧化酶(PPO)和超氧化物歧化酶(SOD))的影响。结果如下: ACP、POD、PPO 和 SOD 4 种免疫相关酶在所取得的 4 种组织中均有分布, 且不同组织各种酶的表达不同, 具有很明显的组织特异性。经不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理后, 罗氏沼虾 4 种组织中的 ACP 等 4 种同工酶酶谱变化主要表现在酶带颜色深浅上, 无酶带的新增和缺失现象, 各组织中的各同工酶酶带数保持不变。并且不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理明显提高了罗氏沼虾体内鳃、肝脏和心脏组织中的

ACP 酶活力, 鳃中的 POD 和 PPO 酶活力, 心脏和鳃中的 SOD 酶活力, 除鳃中的 SOD 酶活力在 62.50mg/L 浓度浸浴时增强作用最显著外, 其余均在 125.00mg/L 浓度浸浴时增强作用最显著。因此, 本实验结果表明浸浴酵母细胞壁多糖能明显提高罗氏沼虾体内的免疫功能, 尤其对鳃中的 4 种免疫相关酶的增强作用最明显, 且在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00mg/L 效果最佳。

2、酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响

利用上述实验确定的最佳浓度 (125.00 mg/L) 酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂对罗氏沼虾进行浸浴处理, 分别在 0h、48h、96h、144h 和 196h 取虾体心脏、肝脏、鳃和肌肉组织, 测定其 ACP、POD、PPO 和 SOD 的活性并结合聚丙烯酰胺凝胶电泳酶谱分析发现, 经酵母细胞壁多糖浸浴不同时间后, 罗氏沼虾 4 种组织中的 POD、PPO 和 SOD 同工酶图谱变化主要表现在酶带颜色深浅上, 而 ACP 酶谱不但在颜色上有一定的变化, 在浸浴时间达到 144h 后, 心脏和肝脏组织中均新增了一条 ACP-4 酶带。酶活力测定结果与酶谱结果相一致, 并且都显示在浸浴时间达 144h 后, 各组织中的 ACP 活力, 鳃和肝脏中 POD 活力以及心脏组织中的 SOD 活力均达到酶活力峰值, 与相应对照组具有显著性差异。鳃和肝脏中 PPO 虽在浸浴 96h 后达到酶活力峰值, 但在 144h 时酶活力仍维持较高水平, 差异依然显著。因此本实验结果表明, 对罗氏沼虾浸浴酵母细胞壁多糖的有效作用时间为 96h 至 144h。

3、不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响

对罗氏沼虾注射不同浓度 (0.0%、1.0%、2.0%和 3.0%) 的酵母细胞壁多糖溶液 0.1ml/尾, 72h 后取虾心脏、肝脏、鳃和肌肉组织, 测定其 ACP、POD、PPO 和 SOD 的活性并结合电泳酶谱来分析研究注射酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾免疫系统的影响。结果发现, 在注射浓度为 2.0%时, 4 种免疫酶活力均有明显提高, 酶带颜色明显加深或变宽, 尤其在肌肉组织中的变化最显著, 表现为其 ACP、PPO 和 SOD 活力均达到峰值, 分别为 38.995 U/L、0.532U_{g.min}⁻¹和 12.297 U/mg, 且都与相应对照组差异显著。心脏组织中的 ACP 活力和肝脏组织中的 POD 活力也达到酶活力峰值, 分别为 89.131 U/L 和 22.517 Eu/(g.min), 也均显著高于对照组。由此表明, 采用 2.0%的酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾进行腹腔注射处理效果最佳。

4、注射酵母细胞壁多糖不同时间后对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响

利用上述最佳注射浓度(2.0%)的酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂对罗氏沼虾进行腹腔注射处理,分别在24h, 48h, 72h, 96h和120h取肝脏、心脏和肌肉组织,测定其ACP和POD的活性。结果发现,心脏和肌肉组织中的ACP活力均在72h后显著提高且均达到峰值,分别为93.0U/L和34.5 U/L。而肝脏组织中的ACP活力在96h才有明显提高,达到峰值284U/L。3种组织中的ACP活力自从上升后均一直维持较高水平,直到120h后依然显著高于对照组($P<0.05$)。由过氧化物酶(POD)活性测定数据显示,经注射酵母细胞壁多糖后,沼虾心脏和肝脏中的POD活力分别于72h和48h后显著提高且达到峰值,分别为5.38 Eu/(g.min)和23.16 Eu/(g.min),均显著高于对照组水平($P<0.05$),且两种组织中的POD活力上升后均维持了24h,分别于96h和72h仍然显著高于对照组。肌肉组织中的POD酶活力虽有提高但变化不明显。总之,实验结果表明酵母细胞壁多糖可以激活沼虾的免疫系统,增强其抵抗病毒的能力,并且对沼虾注射酵母细胞壁多糖48h后就可以起到明显的免疫增强作用,且可维持至120h。

综上所述,采用浸浴和注射的方法均能诱导罗氏沼虾的体液免疫反应,提高各种免疫酶活力,从而增强虾体防病抗病能力。浸浴的给药方法对虾体的作用比较温和但见效较慢,本实验用 125.00mg/L 的酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾 96h 后才有明显的免疫增强效果,144h 时增强效果最佳;而注射的给药方法对虾体的刺激较大但是作用见效相对较快,本实验用 2%的酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾 48h 后就使沼虾体内的免疫力有了明显的提高,且能维持至 120h。

关键词: 罗氏沼虾; 酵母细胞壁多糖; 浸浴; 注射; 酶谱; 酶活力; 同工酶

Title: Effects of Yeast Cell-wall Polysaccharides on Several Immune Related Isoenzymes in *Macrobrachium rosenbergii*

Degree: Zoology

Applicant: WANG Fang

Supervision: Pro.Xu Yan

Abstract

China whose shrimp aquaculture production had reached 31% of the national total is a major producer of breeding shrimp. However, due to the development of intensive aquaculture, the blind expansion of farming and farming scale over-exploitation of water and damaged the ecological balance of water, causing the large population of pathogens to the aquaculture industry in China has brought huge economic losses. According to statistics, only the outbreak of the virus in 1993 made a loss of 80 billion RMB. So how to take effective measures to control these diseases has become a top priority. At first people use drugs to prevent and treat microbial infection in shrimp. However, the generation of drug-resistant microbes brought a new problem to aquaculture, and shrimp disease in the aquaculture industry frequently suffered major losses. Also the drug residues in shrimp harm to human body and pollute the environment. Therefore, Polysaccharide becomes a research hotspot in recent years. The yeast cell wall polysaccharides have been shown to be a good immune enhancers, it can speed up the shrimp immune organ development, enhance and stimulate non-specific. However, the yeast cell wall polysaccharides in the application of aquaculture will be affected by many factors. Therefore, the application, suitable amount and processing time of the yeast cell wall polysaccharides become the current research focus. In this study, the following four groups to probe into the yeast cell wall polysaccharides on the immune system of *M. rosenbergii*, for such substances to the immune system of *M. rosenbergii* provide the basis for the activation mechanism.

1、The effects of some immune related isozymes when *M. rosenbergii* is soaked in different concentration yeast cell-wall polysaccharides

This research first made *M. rosenbergii* soaked in 0.00 mg/l, 31.25 mg/l, 62.50 mg/l, 125.00 mg/l, 250.00 mg/l five concentration yeast cell-wall polysaccharides for 120h, and then measure the enzyme activity and combine electrophoresis to explore the effects of some immune related isozymes(acidic phosphatase (ACP), peroxidase (POD), phenolic oxidase (PPO) and superoxide dismutase (SOD)) from heart, liver, gill and muscles. The changes of four isozymes were analyzed in different tissues of *M. rosenbergii*. The results showed that four isozymes of expression containe clear tissue specificity. Along with the increase of the concentration of the yeast cell-wall polysaccharides, zymography of gill has a most obvious change, followed by liver and heart tissue, muscle tissue zymography hasn't significant change. The enzyme activity also showed the same results. And the zymograms and activities of four isozymes are all changed obviously when the yeast cell-wall polysaccharides concentration is 125.00 mg/l. Therefore, soaking *M. rosenbergii* in 125 mg/L concentration yeast cell-wall polysaccharides could strengthen the body's immunity,

2、The effects of some immune related isozymes when *M. rosenbergii* have been soaked in yeast cell-wall polysaccharides solution for different time

In this study, *M. rosenbergii* was soaked in yeast cell-wall polysaccharides solution, and then measure the enzyme activity and combine electrophoresis to explore the effects of some immune related isozymes(acidic phosphatase (ACP), peroxidase (POD), phenolic oxidase (PPO) and superoxide dismutase (SOD)) from heart, liver, gill and muscles every 48h. The result showed that the activity of ACP in all tissues, POD and PPO in heart and gill, and SOD in heart increased significantly after *M. rosenbergii* was soaked in yeast cell-wall polysaccharides solution for 144h. But ACP and PPO activity have a big decreased after 192h. The physiological mechanism of the phenomenon may be related to living organism negative feedback regulation system. So soaking *M. rosenbergii* yeast cell-wall polysaccharides for 144h could strengthen the body's immunity.

3、The effects of some immune related isozymes when *M. rosenbergii* is injected with different concentration yeast cell-wall polysaccharides

This research first inject *M. rosenbergii* with 0.1ml of 0.0%, 1.0%, 2.0% or 3.0% yeast cell-wall polysaccharides solution every shrimp for 72h, and then measure the enzyme activity and combine electrophoresis to explore the effects of some immune related isozymes (acidic phosphatase (ACP), peroxidase (POD), phenolic oxidase (PPO) and superoxide dismutase (SOD)) from heart, liver, gill and muscles. The result showed that the zymograms and activities of four isozymes changed obviously when *M. rosenbergii* is injected in 2.0% concentration yeast cell-wall polysaccharides. The isozymes in muscle changed strongest of all, because the activities of ACP, PPO and SOD reached the peak, respectively, 38.995 U/L, 22.517 Eu/ (g.min) and 12.297 U/mg. The ACP activity of heart and POD activity of gill also increase obviously. So injecting *M. rosenbergii* 2.0% concentration yeast cell-wall polysaccharides could strengthen the body's immunity

4、The effects of ACP and POD when *M. rosenbergii* have been injected with yeast cell-wall polysaccharides solution for different time

In this study, *M. rosenbergii* was injected with yeast cell-wall polysaccharides solution, and then measure the enzyme activity and combine electrophoresis to explore the effects of ACP and POD from heart, liver and muscles after 24h, 48h, 72h, 96h 和 120h. ACP activity in the heart and muscle were significantly different with the control group ($p < 0.05$), respectively reached the peak of 93.0U/L and 34.5 U/L after 72h. But ACP activity in the liver reached the maximum 284U / L after 96 hours. The ACP activity in these three kinds of tissues were maintained high level, even until after 120h ACP activity were still significantly higher than the control group ($P < 0.05$). The POD activity assay data showed that POD activity in liver and heart respectively increased to the peak of 5.38 Eu/ (g.min) and 23.16 Eu/ (g.min) after 72h or 48h. And the high level of POD activities in these two tissues have maintained for only 24h, and then respectively down to the control group after 96h and 72h. The POD activity in muscle has improved but is still not very satisfactory. In short, the experiment results showed that just after 72h *M. rosenbergii* injected with yeast cell-wall polysaccharides solution has a great improvement in immunity.

In summary, soaking and injection methods can induce humoral immune

responses of *M. rosenbergii* to improve a variety of immune activity, thus enhancing disease prevention and disease resistance. And this study also confirmed that soaking *M. rosenbergii* in 125.00mg/l of yeast cell wall polysaccharides for 144 or injecting 2% of the yeast cell wall polysaccharides can strengthen the shrimp's immunity. However, in the production practice, the method of injection is time consuming and difficult operation, and can not apply to individual small shrimp. The method of soaking will cost larger dosage, but only a little absorbed by shrimp, so further study on oral is necessary. In the experimental operation, a comprehensive analysis of all factors is needful for determining the most appropriate method.

Keywords: *M. rosenbergii*; yeast cell-wall polysaccharides; soak; inject; zymogram; enzyme activity; isozyme

目 录

第一章 绪 论	1
1.1 罗氏沼虾的概述及经济价值	1
1.1.1 罗氏沼虾的概述	1
1.1.2 经济价值	1
1.2 酵母细胞壁多糖的免疫调节作用及其应用研究进展	1
1.2.1 酵母细胞壁多糖的组分	1
1.2.2 酵母细胞壁多糖的活性功能	2
1.2.3 酵母细胞壁多糖在水产养殖中的应用	4
1.3 目前免疫多糖的给药方法	5
1.3.1 浸浴	5
1.3.2 注射	5
1.3.3 口服	5
1.4 生产实践中使用酵母细胞壁多糖的影响因素	6
1.5 小结	7
第二章 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响	8
2.1 材料与方法	8
2.1.1 实验虾	8
2.1.2 酵母细胞壁多糖	9
2.1.3 主要试剂	9
2.1.4 实验仪器	9
2.1.5 实验虾浸浴处理	9
2.1.6 实验样品制备	9
2.1.7 同工酶电泳	10
2.1.8 酶活力测定	11
2.2 结果与分析	11
2.2.1 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中 ACP 的影响	12
2.2.2 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中 POD 的影响	13
2.2.3 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中 PPO 的影响	15
2.2.4 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中 SOD 的影响	17
2.3 讨论	19
2.3.1 罗氏沼虾体内 4 种免疫相关同工酶的组织特异性	19
2.3.2 酵母细胞壁多糖浸浴后沼虾体内免疫相关同工酶的变化	19
2.3.3 小结	21
第三章 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响	23
3.1 材料与方法	23
3.2 结果与分析	24
3.2.1 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中 ACP 的影响	24
3.2.2 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中 POD 的影响	26
3.2.3 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中 PPO 的影响	28
3.2.4 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中 SOD 的影响	29
3.3 讨论	31
第四章 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响	34

4.1 材料与方法	34
4.2 结果与分析	36
4.2.1 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中 ACP 的影响	36
4.2.2 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中 POD 的影响	38
4.2.3 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中 PPO 的影响	40
4.2.4 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中 SOD 的影响	42
4.3 讨论	44
第五章 注射酵母细胞壁多糖不同时间后对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响	47
5.1 材料与方法	47
5.1.1 实验材料	47
5.1.2 酵母细胞壁多糖	47
5.1.3 实验试剂	47
5.1.4 实验仪器	48
5.1.5 对罗氏沼虾的注射处理	48
5.1.6 样品制备	48
5.1.7 酶活力测定	48
5.2 结果与分析	48
5.2.1 注射酵母细胞壁多糖不同时间后对罗氏沼虾体内 ACP 活性的影响	49
5.2.2 注射酵母细胞壁多糖不同时间后对罗氏沼虾体内 POD 活性的影响	49
5.3 讨论	50
5.3.1 两种免疫相关酶的变化	50
5.3.2 两种给药方法免疫增强效果的比较	51
全文结论	53
1 酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾对其体内免疫相关同工酶的影响	53
2 酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾对其体内免疫相关同工酶的影响	53
3 两种给药方法作用效果的比较	54
4 小结	54
致 谢	55
参考文献	56
附 录	62

第一章 绪 论

1.1 罗氏沼虾的概述及经济价值

1.1.1 罗氏沼虾的概述

罗氏沼虾又名淡水长腿大虾、马来大虾、金线虾（台湾），十足目真虾次目长臂虾科^[1]，形体肥大，具有“淡水虾王”的称号^[2]。生长速度很快，食谱较广泛，营养十分丰富，其形态类似于青虾，但个体较大，长可达 40 厘米，重 600 克左右，体色呈淡青色并间有棕黄色的斑纹。尾部的附肢变化成为尾扇，并且每节腹部都有 1 对附肢。头胸部包括 6 节头部和 8 节胸部，外部由硬壳包围。

罗氏沼虾是一类喜营低栖生活的动物，白天一般会潜伏于水底或者水草之中，晚上才出来觅寻食物^[3]。雄性沼虾的第二步足呈蔚蓝色，非常长。但摄食主要靠第一和第二对末端的步足来吞食有机体碎片或者捕捉小动物。沼虾的栖息习性会随着生长发育的不同阶段而变化，幼体喜欢生活在咸淡水中，并且喜集群另有很强的趋光性。经变态后的幼虾则适宜生长在淡水中，常常于水域边缘活动，游泳能力较弱，喜欢栖息于水草或者其它可以攀附的物体上，负趋光性明显，白天多隐蔽起来，夜间才进行觅食、产卵等活动。

1.1.2 经济价值

罗氏沼虾是一种含高蛋白的营养水产品，每百克虾肉内含有蛋白质可达 20.6 克，脂肪仅为 0.6g，还含有身体所必须的微量元素和多种维生素。成熟的罗氏沼虾具有较大的头胸甲，其内充满了生殖腺，味道之鲜美胜似于蟹黄。鲜食可以烹调煎白虾、红焖大虾、琵琶大虾、炒虾仁、溜虾段等。加工可以制成虾米、虾干等的海味品。味道鲜美，肉质鲜嫩，营养丰富，受到了广大群众的喜爱。因此研究罗氏沼虾的免疫系统，增强其个体的抵抗力，从而提高生产具有较高的经济价值。

1.2 酵母细胞壁多糖的免疫调节作用及其应用研究进展

1.2.1 酵母细胞壁多糖的组分

酵母细胞壁多糖是一类真菌多糖，经酵母菌细胞壁破碎及酶解后，经过分离

提纯等的工艺精制而成的。成品为浅灰色的粉状物。酵母细胞壁分为三层，内层为几丁质；中间层为 β -1,3 和 1,6 葡聚糖，外层为甘露寡糖及蛋白质的结合物。

目前国内生产的酵母细胞壁多糖分为两大类。一类含 β -葡聚糖 20%-40%，甘露寡糖 $\geq 20\%$ ，蛋白质含量通常小于 35%，这类酵母细胞壁多糖多用于生产饲料。另一类产品中 β -葡聚糖含量高达 40%-60%，甘露寡糖 $\geq 5\%$ ，蛋白含量小于 15%，这类产品主要用于化妆品的生产。本实验所用酵母细胞壁多糖属于前一种，由湖北省安琪酵母公司友情提供。

1.2.2 酵母细胞壁多糖的活性功能

(1) 诱导生物机体产生体液免疫反应

酵母细胞壁多糖中含有大量 β -葡聚糖。 β -葡聚糖与其他糖类不同，具有其特殊的结构。 β -葡聚糖单糖之间以 β -1,3 或 1,6 键相结合，而非一般糖类单糖之间的 β -1,4 键相连。正是这种特殊的键连接方式使 β -葡聚糖的分子结构呈螺旋形。而这种特殊的结构又很容易被免疫系统所识别。动物体的大量的巨噬细胞一般不具有活性，但当 β -葡聚糖与巨噬细胞表面上 LECTIN 结合后，就会激活巨噬细胞，刺激机体产生一系列体液免疫反应，从而使机体非特异性免疫力增强。

在鱼类动物体内， β -1,3 葡聚糖通过结合巨噬细胞和嗜中性细胞上的 β -1,3 葡聚糖受体，致使巨噬细胞向着病灶迁移。提高了血细胞的溶解作用以及活性氧自由基的产量，促使生物机体的抗病毒活性、杀菌活性和抗应激反应的能力也大大提高^[4]。另外 β -1,3 葡聚糖还能与鱼类体液中的相关补体片段结合，使补体系统被激活，从而产生较强烈的免疫调节反应^[5]。在体外试验中 β -1,3 葡聚糖可以促使大西洋鲑 (*Salmo Salar*) 巨噬细胞呼吸爆发，噬中性粒细胞活性增强^[6]。

(2) 抗病毒作用

酵母细胞壁多糖对病毒不但有灭活作用，并对细胞内外的病毒还有抑制其繁殖的功能。并且酵母细胞壁中的 β -葡聚糖还能够提高淋巴细胞的抗体水平及抗病的能力。在畜禽的养殖方面，日粮中添加 β -葡聚糖可以有效的降低患猪流感病的几率^[7]；使断奶仔猪猪瘟抗体明显提高^[8]；使幼仔鸡血清中的抗绵阳红细胞 (SR-BC) 抗体的总量以及 IgG 的含量上升，增强动物机体的记忆应答反应^[9]。

在水产养殖方面，能使水产类动物对细菌性疾病的抵抗力有明显增强。1994 年 Sung H H^[10]利用酵母细胞壁多糖浸泡斑节对虾 (*Penaeus monodon*)，增强了对

虾对创伤弧菌 (*V.vulnificus*) 抵抗能力, 并持续了 18d。对大西洋鲑腹腔注射酵母细胞壁多糖后, 增强了鲑对鲁克氏耶尔森氏菌 (*Yersinia ruckeri*)、鳗弧菌 (*V.anguillarum*) 以及杀鲑气单胞菌 (*A.salmonicida*) 的抵抗能力^[11-13]。陈昌福对南美白对虾口服酵母细胞壁多糖 (100.00mg/kgBm) 后, 能显著增强南美白对虾的抗哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染的能力。

(3) 促进生长, 提高饲料的转换效率

酵母细胞壁多糖的主要功能成份是 β -葡聚糖, 国内外有研究表明 β -葡聚糖能显著促进对虾的生长和降低饲料系数。Lopez N 曾报道 β -葡聚糖可以使凡纳滨对虾的日增重率提高^[14]。Sung 的研究也证实 β -葡聚糖能够促进对虾的生长^[10]。Wigglesworth^[15] 等的研究也认为对虾可以消化 β -葡聚糖, 因此推测出 β -葡聚糖促生长的作用原理是由于其能被消化提供机体生命活动所需的能量, 从而节约了蛋白质。

但也有研究表明, 饲料中添加 β -葡聚糖对细点牙鲷 (*Dentex dentex*) 和蟾胡鲶 (*Clarias bartachus* L.) 的生长并没有显著影响。王忠^[8]等的研究也发现, 饲料中添加 β -葡聚糖对哺乳仔猪的生长发育并没有显著的影响。不同学者研究中出现了差异, 可能是由于 β -葡聚糖提取的方法不同, 导致空间结构和纯度发生变化^[16], 还有添加剂量, 养殖周期, 饲养条件和实验动物大小种类的有所不同的缘故。酵母细胞壁多糖中的 β -葡聚糖是一种较好的免疫激活剂, 在提高动物体对病原菌的抵抗能力的同时, 也能促使营养物质的重新分配, 从而降低了动物机体的增重率。

(4) 吸附病原菌, 抑制肠道病原菌的生长

酵母细胞壁多糖具有吸附病原菌的功能主要源于其内含有甘露聚糖^[17]。甘露聚糖能够抑制肠道病原菌的繁殖, 从而使动物肠道内的原微生物的数量降低。肠道内的病原菌 (如大肠杆菌, 真杆菌, 梭状芽孢杆菌) 和病毒细胞壳上都有一种蛋白质—Letin。这些有害的微生物就是通过这种蛋白与动物体内肠道内壁糖类结合而附着在肠道上进行繁殖, 并分泌毒素, 诱发各种疾病。而酵母细胞壁中的甘露聚糖结构与动物肠道上病原菌受体结构非常相似^[17], 因此, 甘露聚糖可以竞争性的与病原菌结合。并且酵母细胞壁多糖具有一定的耐酸性, 在通过消化道时就不会被胃酸和消化酶所降解。因此, 酵母细胞壁多糖具有非常广泛的应用价值。

1.2.3 酵母细胞壁多糖在水产养殖中的应用

近几年来,水产疾病频发,造成养殖户泛滥使用药物,造成了新的药害,影响到了水产品的安全与品质。水产养殖步入了病害,治疗,污染,再治疗的恶性循环。人们对水产品的安全品质越来越关注,健康养殖已成为人们瞩目的焦点^[18]。在养殖过程中,使用免疫多糖来提高水产动物的自身免疫能力,增强其防病抗病能力是一种有效的健康养殖途径,有大量的研究表明,酵母细胞壁多糖具有提高动物自身免疫力,增强抗病力,减少不良应激,使动物生产性能提高等作用。并且酵母细胞壁多糖在水产动物中的应用低毒,无残留。因此酵母细胞壁多糖的应用对我国水产养殖业健康发展具有十分深远的影响。

(1) 在虾类中的应用

外国学者在虾类中做了大量的实验,证实了酵母细胞壁多糖能够使虾类的非特异性免疫力增强。Sung^[10]等采用从酵母中提取出来的 β -1,3-葡聚糖的溶液浸泡斑节对虾(*Penaeus monodon*),发现对虾的溶菌酶和酚氧化酶活性均有提高,且抗创伤弧菌(*V.vulnificus*)的能力增强,并持续了18d。汪晓锋等^[19]也观察到,用酵母 β -葡聚糖分别对虎虾进行体内和体外刺激处理后可以显著增强其血淋巴酚氧化酶活力。

我国学者在酵母细胞壁多糖对虾类免疫能力的影响方面也进行了很多研究。许第新^[20]等以酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂注射克氏原螯虾后发现其肝胰腺中的碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)活性有明显增强。陈昌福^[21]的研究也表明,在南美白对虾饲料中添加酵母细胞壁多糖可以显著提高对虾肌肉和血清中的ALP和ACP活性,并使肝胰脏中的过氧化物酶(POD)、ALP和ACP活性也有极显著增强。Chang CF等^[22]有报道称用含有适量 β -葡聚糖的饲料来饲喂草鱼,可显著改善其超氧化物歧化酶(SOD),酚氧化酶(PPO)等免疫指标的活性。

(2) 在鱼类中的应用

Steiner M等^[23,24]发现,酵母葡聚糖可提高大西洋大麻哈鱼巨噬细胞内溶菌酶的产量。Engstad^[25]等也报道,大西洋鲑经注射酵母 β -葡聚糖后,血清溶菌酶的活性有所提高。陈超然等^[26]的研究表明,添有酵母 β -葡聚糖的饲料在可促进异育银鲫的生长发育,而且添加量为250.0/kg·d时效果最佳。用含酵母 β -1,3-葡

聚糖的饵料饲喂非洲鲶鱼 (*Clarias gariepinus*) 30d 后, 其 NBT-阳性细胞数量明显上升, 达到了高峰, 并且溶菌酶活性持续 50d 都高于对照组^[27]。罗璋等^[28]还报道用添有定量酵母免疫多糖的饲料来投喂斑点叉尾鲷不仅能增强其免疫应答能力, 还会提高斑点叉尾鲷抗灭活嗜水气单胞菌的能力, 在一定程度上还促进了斑点叉尾鲷的生长并改善了其肝功能。

(3) 在其他水产动物中的应用

除了虾、鱼外, 酵母细胞壁多糖在其他水产动物中的应用较少。陈昌福^[29]在中华绒螯蟹的饲料中添加酵母细胞壁多糖, 能使中华绒螯蟹的抗病力增强。给日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 投喂含有酵母细胞壁多糖的饵料, 能增强其非特异性免疫能力^[30]。用酵母葡聚糖注射栉孔扇贝 1h、15h 和 30h 后 ACP 活力均有极显著性提高^[31]。张起信^[32]利用加有 5%口服型免疫多糖的饵料来饲喂杂交鲍苗, 使其成活率明显上升。

1.3 目前免疫多糖的给药方法

1.3.1 浸浴

浸浴的给药方法比较适合幼虾, Sung^[10]利用不同浓度的 β -葡聚糖来浸泡 PL30 斑节对虾幼虾, 发现 0.5、1、2mg/mL 能显著促进对虾的生长, 并且 0.5 和 1mg/mL 的 β -葡聚糖浓度显著提高了对虾的酚氧化酶活力以及抗菌能力。Song^[33]用 0.5mg/ml β -葡聚糖浸泡 PL15 斑节对虾幼虾, 研究发现对虾的抗运输、抗捕捉以及抗氨氮能力也有明显的增强。但浸泡法所需的药物量较大, 往往使用了大量的免疫多糖药物, 只有很小部分被水产生物所吸收。

1.3.2 注射

许多报道^[34,35]认为, 注射的给药方法能有效的提高白细胞功能, 增强抗病毒能力。李红权^[36]采用注射方式比较香菇多糖、灰树花多糖和赤芝多糖对日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 和日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 的效果, 结果三种多糖都具有明显的免疫激活作用。但是这种方法相对较费时费力, 并且个体较小虾类不适宜采用^[37]。

1.3.3 口服

口服比较适合体型较小的生物, 且不会对虾蟹等水产类动物产生应激作用

[38]。许国焯^[39]等发现,对南美白对虾投喂含有 β -葡聚糖和酵母细胞壁的饲料都能明显提高其超氧化物歧化酶、溶菌活力及酚氧化酶活性,提高机体抗病能力。2000 年 Cheng 等^[40]对斑节对虾投喂裂褶菌多糖 24h 后,其超氧阴离子产量增加且血细胞吞噬活性有明显增强。但口服法会受到消化道中的各种消化酶影响,因此免疫促进剂的效果很可能会下降。

目前免疫多糖的使用方法主要分为以上 3 种。但不同的对象,不同的给药方法会带来不同的结果。Selvaraj^[41,42]等利用 β -葡聚糖对对鲤 (*Cyprinus carpio*) 进行注射,浸浴和口服处理 1-5d 后,测定 β -葡聚糖对对鲤超氧阴离子生成的影响,发现只有注射的给药方式作用明显。因此,在生产实践中必须综合评价各种影响因素后,再确定最佳的使用方法

1.4 生产实践中使用酵母细胞壁多糖的影响因素

1.4.1 酵母细胞壁多糖所含功能成分的实际含量

不同的厂家、不同的生产工艺及不同种类的酵母都能影响酵母细胞壁中功能物质的含量。

1.4.2 酵母细胞壁多糖的处理时间及处理浓度

有研究表明用酵母细胞壁多糖,肽聚糖等多糖类免疫促进剂对水产生物进行处理时,如果处理时间较长,药物就有可能失效,甚至会产生副作用。Miyazano 和 Matsuo^[43]用肽聚糖处理虹鳟鱼 28d 后其对鳃弧菌 (*V. anguillarum*) 的抵抗能力明显提高,但当处理时间达到 56d 时,虹鳟鱼的免疫力则未增强。导致此种现象的生理机制很有可能与免疫促进剂的负反馈调节系统有关,它能使生物的免疫系统恢复到原来的状态^[44]。因此,在使用酵母细胞壁多糖等免疫促进剂时要注意其有效作用期限,确定最佳处理时间。

酵母细胞壁多糖的功能成分主要为 β -葡聚糖,有研究表明 β -葡聚糖的添加量适宜时对生物体具有免疫促进的作用,但若过量就会产生一定的副作用。Sung 等^[10]在 1993 年采用从酵母中提取的 β -葡聚糖浸泡斑节对虾,尽管在 0.5, 1, 2g/L 的药物浓度下对虾生长均比对照组快,但 2g/L 的实验组虾的鳃组织有明显的病变现象,因为药物浸浴的浓度太高导致鳃承担过大的渗透压。Scholz^[45]认为对水产生物长期投喂葡聚糖,其剂量是一个需要考虑的重要问题。因此,在使用含有

β -葡聚糖的酵母细胞壁多糖时也要注意其有效作用剂量, 确定最佳的药物处理浓度。

1.4.3 不同种类、不同年龄阶段的水产动物酵母细胞壁多糖添加量有异

水产动物的分属很广, 含有甲壳类(虾蟹等)、两栖类(蛙)、鱼类、爬行类(龟鳖等)等, 视不同养殖动物的品种、规格及环境的差异可酌情增减药物的添加量。

1.5 小结

综上所述, 酵母细胞壁多糖能诱导刺激机体产生体液免疫和细胞免疫, 抗病毒, 促进生长, 提高饲料的转换效率, 吸附病原菌, 抑制肠道病原菌的生长等功能。而且酵母细胞壁多糖在水产动物中的应用低毒, 无残留。对我国水产养殖业的健康发展具有深远的影响。然而酵母细胞壁多糖在生产实践中的应用还有很多的内容值得我们探讨, 例如酵母细胞壁多糖的给药方法, 适宜使用量和处理时间等, 当这些问题都得以解决后, 酵母细胞壁多糖将成为一种很有效的免疫物质来控制及预防虾类疾病。

第二章 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响

酵母细胞壁多糖是一类酵母真菌多糖,通常为浅灰色的粉状物。纯的酵母细胞壁分为三层,内层为几丁质;中间层为 β -(1,3), β -(1,6)葡聚糖,外层为甘露聚糖和蛋白质结合物。酵母细胞壁多糖能诱导刺激机体产生体液免疫和细胞免疫,抗病毒,促进生长,提高饲料的转换效率,吸附病原菌,抑制肠道病原菌的生长等功能。而且酵母细胞壁多糖在水产动物中的应用低毒,无残留,对水产养殖的健康发展具有十分重大的意义。很多人将酵母细胞壁多糖混入饲料中对虾进行投喂^[46-47]、浸浴^[47]或注射的方式来增强虾的免疫能力。采用浸浴的方法可以直接提高虾的抗应激及抗病能力。Alabi 用新鲜和冷冻的干燥的哈维氏弧菌浸浴印度对虾,发现对虾的抗菌能力有明显的提高^[48]。Song 用 0.5mg/mL β -葡聚糖浸浴 PL15 斑节对虾幼体,研究发现对虾的抗运输、抗捕捉以及抗氨氮能力有明显的增强^[33]。但是,关于这类免疫增强剂对机体免疫系统的激活机理,仍然缺乏深入系统的研究。在对甲壳动物的研究中,已把 PPO、POD、SOD、ACP 等同工酶看作是具有免疫功能的酶,可作为检测甲壳动物免疫功能的指标酶^[49-50]。国内外对免疫增强剂与水产动物免疫系统功能的关系研究主要集中在鱼类等水产动物的生长和血清中溶菌酶活性和巨噬细胞吞噬活力等抗病力上,而以淡水养殖虾类的免疫相关同工酶为对象的研究很少见。因此本实验利用不同浓度的酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂对罗氏沼虾进行浸浴处理,120h 后取虾心脏、肝脏、鳃和肌肉组织,分别测定其 ACP、POD、PPO 和 SOD 等 4 种免疫相关酶活力并结合同工酶凝胶电泳酶谱分析,来探讨酵母细胞壁多糖这种免疫促进剂对罗氏沼虾体内免疫系统的作用机理,并为酵母细胞壁多糖在虾类等水产养殖生产实践中的应用提供参考。

2.1 材料与方法

2.1.1 实验虾

2010 年 8 月份从上海市冠生园路徐汇区漕河泾菜市场购买个体大小均一并健康(长度约为 8-10cm、重量约为 10-15 克)的罗氏沼虾,分养于聚乙烯水簇

箱（长×宽×高=58cm×43cm×39cm）中，每个聚乙烯水簇箱放养 20 尾沼虾。

2.1.2 酵母细胞壁多糖

本实验酵母细胞壁多糖由湖北省安琪酵母有限公司提供。该产品中主要成分为 β -葡聚糖 $\geq 20\%$ ， α -甘露聚糖肽 $\geq 20\%$ ，几丁质 $\geq 2.0\%$ ，肽类及蛋白质 $\geq 30\%$ 。

2.1.3 主要试剂

氯化硝基四氮唑兰、邻苯二胺、过硫酸铵、核黄素、Tris、邻苯二酚、草酸、NBT、EDTA、Acr、TEMED、双氧水、Bis、谷氨酸、L-DOPA、愈创木酚等试剂均购置于国药集团试剂公司；对硝基苯磷酸二钠盐购于上海楷洋生物技术公司。超氧化物歧化酶活力及总蛋白含量测定采用试剂盒法，购于南京建成生物研究所。

2.1.4 实验仪器

METTLER TOLEDO 320-S pH 计	梅特勒-托利多仪器有限公司
电子天平 FA1004	上海天平仪器厂
DHP-9082 型电热恒温培养箱	上海一恒科技有限公司
HHS-2S 型电热恒温水浴锅	上海跃华医疗器械厂
玻璃匀浆器	浩天生物器材制造厂
TU-1810 紫外可见分光光度计	北京普析通用仪器有限责任公司
台式冷冻高速离心机	上海安亭科技仪器厂
FD201 稳压稳流电泳仪	上海医用分析仪器厂

2.1.5 实验虾浸浴处理

将实验虾在实验室暂养两天后，加入 60 L 含有不同浓度酵母细胞壁多糖的水，实验分 5 个浓度处理组，0.00mg/L、31.25 mg/L、62.50mg/L、125.00mg/L、250.00mg/L。每天 7: 30 和 17: 30 各投饵一次，换水 1/3，用虹吸法去除多余饵料和排泄物。将水温保持在 23℃左右，用充气泵连续不停的充气。

2.1.6 实验样品制备

粗酶液：经过酵母细胞壁多糖溶液浸浴 120h 后，从每个处理组中随机抽取 10 尾沼虾迅速放入冰盘解剖，取虾体的心脏，肝胰脏，肌肉和鳃 4 种组织，用滤纸吸干组织液以后称重，以 1: 3 (W/V) 的比例加入预冷的 pH7.0 的磷酸缓冲液 (0.1mol/L PBS)，置于冰块中用匀浆器匀浆。匀浆后于 4℃条件下以

12000r/min 离心 30 min, 之后取上清液作为粗酶液。

电泳待测酶液: 从每种组织的粗酶液中取出 200ul 与电泳上样缓冲液(取 2ml 的浓缩胶缓冲液, 1ml 87%的甘油和少量蔗糖及 0.1 溴酚蓝混匀)按 1: 1 (V/V) 充分混匀后分装, 作为电泳待测酶液置于-20℃冰箱中备用。

酶活力待测酶液: 其余粗酶液按 2: 3 (V/V) 的比例加入预冷的磷酸缓冲液 (0.1mol/L pH7.0 PBS), 充分混匀后分装, 作为酶活力待测酶液置于-20℃冰箱中备用。

2.1.7 同工酶电泳

(1) 电泳方法

采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳, 7%分离胶 (pH8.9), 3%浓缩胶 (pH6.7), Tris-Gly (pH8.3) 电极缓冲液^[51]。每孔的加样量为 30ul, 开始时控制电压为 80V, 观察溴酚蓝指示剂进入分离胶时, 增大电压至 100V, 当指示剂电泳至分离胶的底部时停止电泳, 将凝胶小心的剥离入培养皿中, 进行染色。电泳过程中保持温度为 4℃。

(2) 染色与固定

ACP 染色与固定: 1-萘基磷酸钠和坚牢蓝 RR 盐各取 100 mg, 溶于 100 ml 醋酸缓冲液 (0.2mol/L⁻¹, pH 5.0) 中, 制成染色液。将蒸馏水漂洗后的凝胶浸入染色液中染色 30min, 保持环境温度为 37℃。直至凝胶出现褐色条带, 用 7%醋酸脱色, 终止反应。

POD 染色与固定: 取 0.1g 联苯胺, 1.5 mol/L 乙酸钠及乙酸各 10 ml 及无水乙醇 5 ml 溶于 75 ml 双蒸水中配制成染色液, 在染色前往染色液里滴加 5-6 滴 H₂O₂ 原液, 待凝胶出现明显条带后, 用 7%醋酸固定, 终止染色反应。

PPO 染色与固定: 将凝胶浸泡在含有 0.06%邻苯二胺, 1%邻苯二酚及 0.05 mol/L PBS (pH 6.8) 中 30min 后, 待出现深棕色酶带后用固定液 (36%醋酸, 95%乙醇及双蒸水以 2: 3: 3 的体积比混匀) 固定, 后至于双蒸水中。

SOD 染色与固定: 在暗室中将凝胶浸于 50ml 2.45×10^{-3} mol/L 的 NBT 溶液中反应 20 min, 之后将凝胶移入到含有 2.8×10^{-5} mol/L 核黄素, 0.028 mol/L TEMED, 及 0.036 mol/L PBS (pH 7.8) 的溶液中浸泡 15 min。最后取 0.0029g EDTA 与 0.05 mol/L PBS (pH 7.8) 配制成 100ml 溶液, 充分混匀后使凝胶浸泡其中,

并于 4000lx 光照下照射 30 min, 待凝胶出现明显条带后, 用 7%醋酸终止反应。

(3) 电泳结果处理

电泳结果采用两种方法记录, 首先利用凝胶成像系统对染色固定过的凝胶进行拍照。之后, 根据酶带的染色深浅及迁移距离并参照照片, 绘制出酶谱示意图。本论文中的酶带编号均遵循国际生物化学命名的规则^[52], 把向阳极运动最快的酶带进行编号为 1, 且按照从阳极至阴极的顺序依次编号。

2.1.8 酶活力测定

(1) 酶活力测定方法

ACP活力测定方法: 参照文献^[53]利用磷酸苯二钠为底物来测定实验虾心脏、鳃、肝胰腺和肌肉4种组织提取液中ACP的酶活力。酶活力单位: 在37℃水浴中每100 ml的样品与底物作用60 min后, 并产生1.0mg酚记作为1个ACP酶活力单位。

POD 活力测试方法: 参照文献^[54,55], 首先往 50ml 0.1mol/L 的 PBS (pH7.0) 中加入 19ul 30%的双氧水和 28ul 的愈创木酚制成反应液。之后, 将反应液与酶液以 1: 3 (V/V) 的比例混匀, 于 470nm 波长下测定光吸收值。每隔 1min 测定一次, 并记录数据, 测定 15min。酶活力单位: 每分钟内光吸收值变化 0.01 记作为 1 个 POD 酶活力单位。

PPO 活力测定方法: 参照 Ashida^[56]等的方法, 以 $0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-DOPA 为特异性底物, 将 0.1ml 待测酶液与 0.1ml 底物于 28℃恒温水浴中混匀, 使之反应 40min 后, 加入 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾盐缓冲液 (PH6.0) 1.3ml, 于 490nm 波长下测定光吸收值, 每隔 2min 测定一次, 并记录数据, 测定 15min。酶活力单位: 每分钟内光吸收值变化 0.001 记作为 1 个 PPD 酶活力单位。

SOD活力测定方法: 采用南京建成生物研究所生产的试剂盒法。酶活力单位: 每毫克组织蛋白在1ml的反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量记作为一个SOD酶活力单位 (U)。

(2) 酶活力结果处理

以平均值±标准差来表示各平行组酶活力值, 并采用SPSS多重比较法来分析显著性差异。

2.2 结果与分析

2.2.1 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中 ACP 的影响

由图 2.1 可知，罗氏沼虾 ACP 电泳图谱共检测出四条酶带，且不同组织中的 ACP 酶带数及颜色深浅存在差异。鳃中表达的酶带数最多，有 ACP-2,3,4 三条酶带。心脏和肝脏中均只表达一条颜色较深的酶带，分别为 ACP-2 和 ACP-1。肌肉组织表达最弱，有 ACP-1,3 两条颜色浅且细的酶带。即 ACP 在 4 种组织中的表达具有组织特异性，鳃组织中的酶表达最强烈，其次是肝脏和心脏组织；肌肉组织中的酶带表达最弱。

经不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理后，罗氏沼虾 4 种组织中的 ACP 酶谱变化主要表现在酶带颜色深浅上，而各组织中的 ACP 酶带数均保持不变。其中变化最明显的是鳃和肝脏组织，表现为各浸浴处理组的酶带颜色明显比对照组深，且在 125.00mg/L 时酶带颜色最深；其次是心脏组织，酶带颜色逐渐加深，在 125.00mg/L 浓度时达到最深；而肌肉组织中的两条酶带（ACP-1,3）则没有明显变化。即不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理能明显提高罗氏沼虾体内鳃、肝脏和心脏组织中的 ACP 活力，且在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00mg/L 时其作用效果最显著。

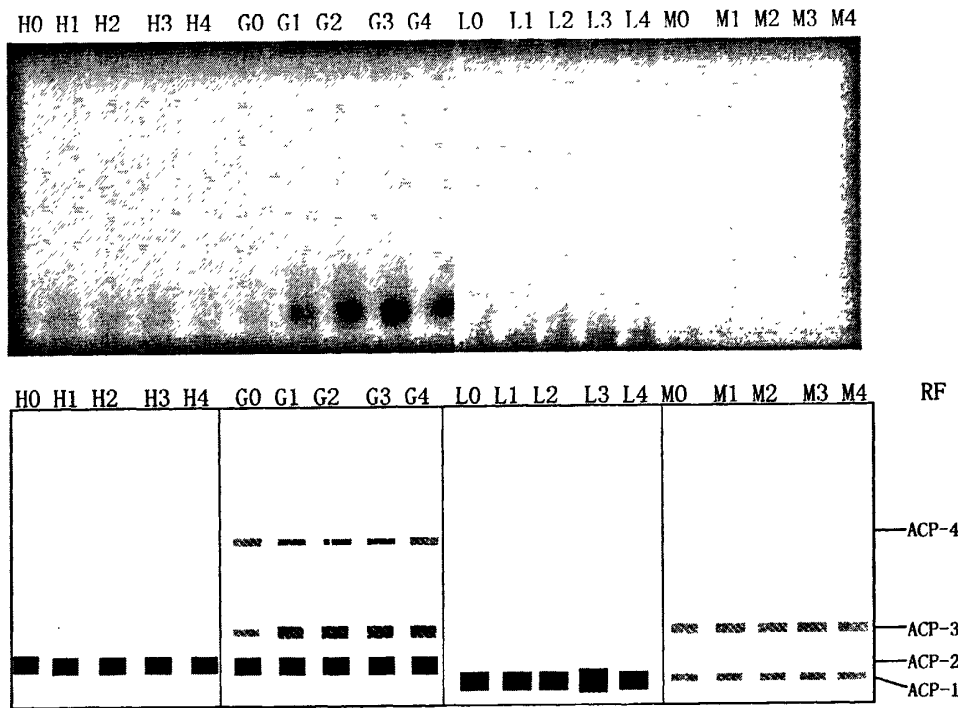


图 2.1 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴后罗氏沼虾 4 种组织中 ACP 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉；0、1、2、3、4 分别代表酵母细胞壁多糖浓度 0.00mg/L、31.25 mg/L、62.50mg/L、125.00mg/L、250.00mg/L。

由表 2.1 可知，ACP 在肝脏中活力最强，其次是鳃和心脏中，肌肉中最弱。经不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理后，罗氏沼虾心脏，肝脏和鳃 3 种组织中的 ACP 酶活力与对照组相比均有明显变化，其中各浓度处理组鳃组织中的 ACP 酶活力均显著或极显著高于对照组，心脏和肝脏中的 ACP 酶活在 31.25mg/L、62.50mg/L 和 125.00mg/L 时显著或极显著高于对照组，且 3 种组织中的 ACP 酶活力均是在 125.00mg/L 时达到最大。而各浓度处理组肌肉组织中的 ACP 酶活力均无明显变化。结果显示与 ACP 酶谱分析结果一致，表明不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理能明显提高罗氏沼虾体内鳃、肝脏和心脏组织中的 ACP 酶活，125.00mg/L 浓度作用时 ACP 酶活力均达到峰值。

表 2.1 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中酸性磷酸酶（ACP）活力的影响

酵母细胞壁多糖浓度 (mg/L)	酸性磷酸酶活力/U·L ⁻¹ ±SD(n=3)			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0.00	57.100±3.131	51.026±0.926	146.124±2.984	33.960±1.183
31.25	60.104±2.357	62.349±2.922*	151.266±3.163*	35.567±2.902
62.50	65.134±0.401**	72.633±3.919*	164.3336±3.939*	35.138±0.401
125.00	72.419±0.993**	77.669±1.707**	182.762±6.829*	35.888±0.660
250.00	54.529±1.347	68.777±2.503*	143.553±4.242	37.067±1.862

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（P<0.05）或极显著（P<0.01）差异。

2.2.2 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中 POD 的影响

由图 2.2 可知，罗氏沼虾 POD 电泳图谱共检测出三条酶带，且不同组织中的 POD 酶带数及颜色深浅也同样存在差异。在鳃和肝脏中各表达有 2 条酶带 (POD-1,2 和 POD-2,3)，心脏和肌肉中均只表达了 1 条酶带（POD-2），其中鳃中 POD-1 酶带颜色最深。即 POD 在鳃中表达最强，其次是在心脏和肝脏组织中，肌肉组织中的表达最弱。

不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理后，罗氏沼虾心脏和鳃两组织中的 POD 酶谱有明显变化，心脏中的 POD-2 酶带在酵母细胞壁多糖浓度低于 250.00mg/l 时酶带颜色逐渐加深，但是在 250.00mg/l 浓度时酶带颜色明显变浅；鳃中 POD-1,2 两条酶带先随着酵母细胞壁多糖浓度的提高，酶带颜色逐渐加深，酶带变宽，但在浓度为 250.00mg/l 时，酶带也又变浅变窄。肝脏和肌肉组织中酶带随着酵母细

胞壁多糖浓度的提高均无明显的变化。总之，随着酵母细胞壁多糖浓度的提高，罗氏沼虾 4 种组织中的 POD 酶谱发生了一定的变化，尤其在鳃组织中的变化最明显，表现为其 POD 在酵母细胞壁多糖浸浴浓度为 62.50mg/L 和 125.00mg/L 时表达最强。

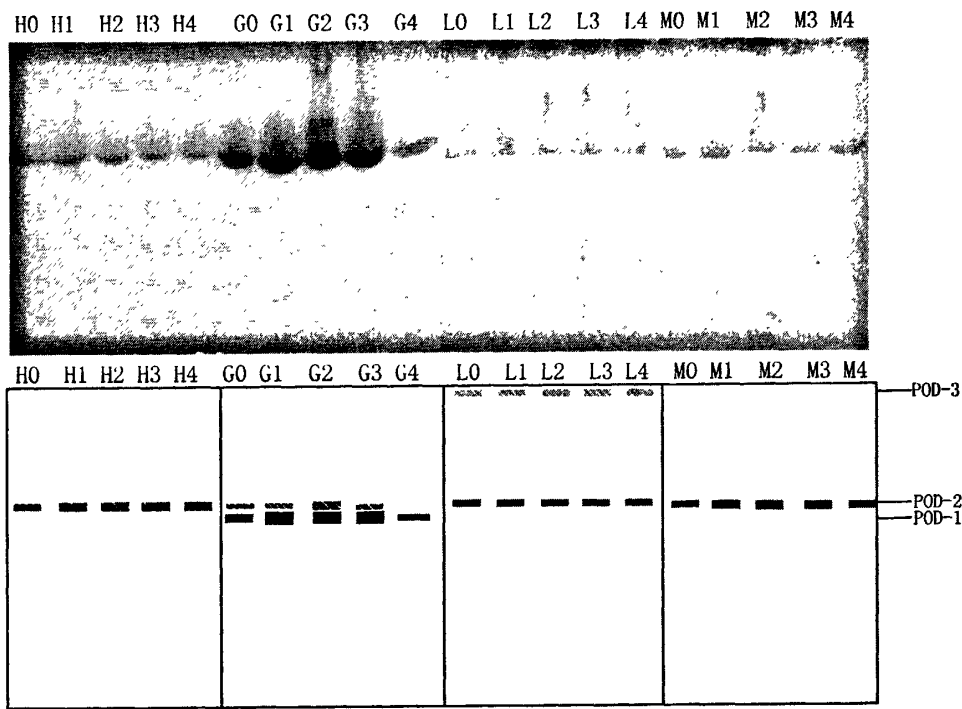


图 2.2 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴后罗氏沼虾 4 种组织中 POD 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉；0、1、2、3、4 分别代表酵母细胞壁多糖浓度 0.00mg/L、31.25 mg/L、62.50mg/L、125.00mg/L、250.00mg/L。

由表 2.2 可知，在鳃和肝脏中的 POD 活力最强，其次是心脏组织，肌肉组织中的过氧化物酶活力最弱，与电泳酶谱结果相一致。随着酵母细胞壁多糖浓度的提高，鳃组织中的酶活力变化最显著，其他组织中均无明显的变化。心脏组织中的 POD 活力先增加，在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00 mg/L 时，达到最大值 10.057 Eu/（g•min），但与对照组无明显差异，随后酶活力又略有下降；鳃组织中的 POD 活力也呈现先上升后下降的趋势，在酵母细胞壁多糖浓度为 62.50mg/L 和 125.00mg/L 时出现了显著性差异。且在浓度为 125.00mg/L 时达到了峰值 20.826 Eu/（g•min）；肝脏组织中的 POD 活力呈现逐渐上升的趋势，但与对照组均无显著性差异；肌肉组织中的 POD 活力先下降后略有上升，但各实验组的酶活力与对照组也均无明显差异。结果表明酵母细胞壁多糖浸浴处理能明显提高罗氏沼虾体内鳃中的 POD 活力，且在 62.50mg/L 和 125.00mg/L 浓度时增强作用

最显著。

表 2.2 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中过氧化物酶（POD）活力的影响

酵母细胞壁多糖浓度 (mg/L)	过氧化物酶活力 Eu/（g·min）±SD (n=6)			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0.00	8.633±0.816	16.376±0.938	13.795±1.631	1.424±0.154
31.25	8.900±0.408	17.533±0.816	14.774±1.471	1.246±0.154
62.50	9.345±0.267	19.135±0.938*	14.507±0.858	1.335±0.267
125.00	10.057±0.408	20.826±0.963*	15.486±1.487	1.424±0.154
250.00	9.078±0.534	14.062±1.080	16.198±1.471	1.246±0.154

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（P<0.05）或极显著（P<0.01）差异。

2.2.3 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中 PPO 的影响

由图 2.3 可知，罗氏沼虾 PPO 电泳图谱共检测出两条酶带，且不同组织中的 PPO 酶带数及颜色深浅依然存在差异。4 种组织中，鳃的 PPO 表达最强烈，呈现两条酶带；心脏、肝脏和肌肉中只表达了一条酶带。

不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理后，心脏组织中的酶带颜色呈规律性变化，酶带颜色逐渐加深，在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00 mg/L 时酶带颜色达到最深，而后又略有变浅；鳃中呈现了 PPO-1 和 PPO-2 两条酶带，其中 PPO-1 酶带颜色先逐渐加深，在酵母细胞壁多糖浓度为 62.50mg/L 最深，之后又略有变浅。肝脏组织中的 PPO-2 酶带没有明显的变化，只是 4 个实验组酶带颜色都略有加深；肌肉组织中也仅表达了一条酶带（PPO-2），在酵母细胞壁浓度为 62.50mg/L 和 125.00 mg/L 时，酶带颜色略有加深，其余浓度时无明显变化。总之，随着酵母细胞壁多糖浓度的提高，罗氏沼虾 4 种组织中的 PPO 呈现了一定的变化，尤其在鳃组织中的变化最明显，其两条酶带在酵母细胞壁浓度为 62.50mg/L 和 125.00mg/L 时表达最强。

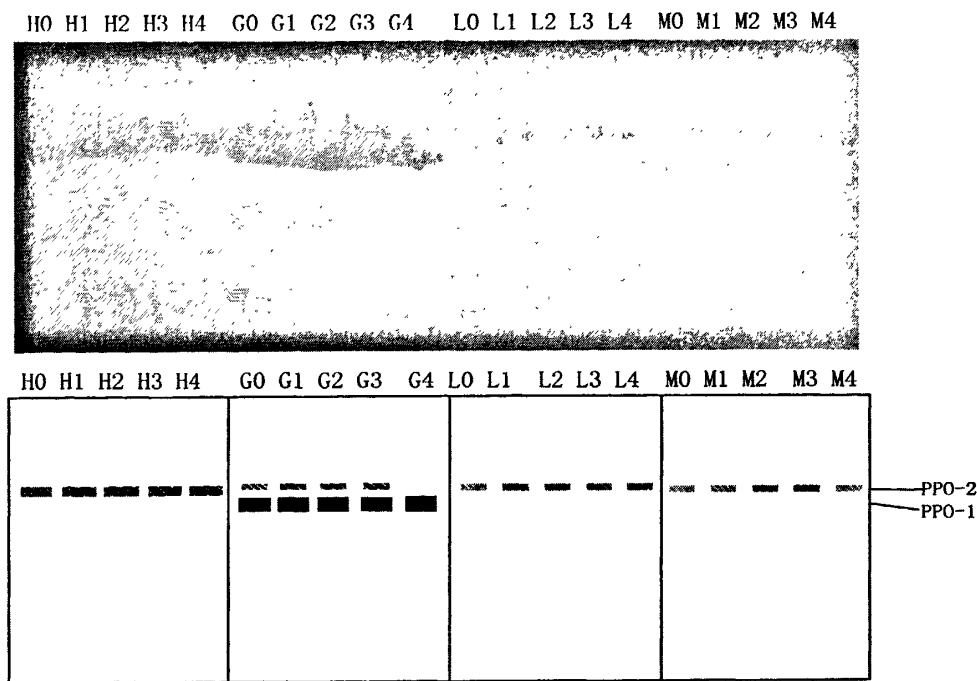


图 2.3 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴后罗氏沼虾 4 种组织中 PPO 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉；0、1、2、3、4 分别代表酵母细胞壁多糖浓度 0.00mg/L、31.25 mg/L、62.50mg/L、125.00mg/L、250.00mg/L。

由表 2.3 可知，在心脏和鳃组织中多酚氧化酶活力最强，肝脏和肌肉中较弱。不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理后，鳃组织中的酶活力变化最显著，其他组织中均无明显变化。心脏组织中的酚氧化酶活力先降低，然后在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00 mg/L 时提高，达到最大值 0.448 U，但与对照组无明显差异，随后酶活力又略有下降；鳃组织中各实验组的酶活力均与对照组有显著性差异，且在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00mg/L 时出现了极显著性差异，达到峰值 0.827U，随后在酵母细胞壁多糖浓度为 250.00mg/L 时，酶活力下降，但与对照组仍具有显著性差异；肝脏组织中的 PPO 活力先逐渐上升，之后在酵母细胞壁多糖浓度为 250.00mg/L 时略有下降；肌肉组织中的 PPO 活力也呈现先升高后下降的趋势，在酵母细胞壁多糖浓度为 62.50mg/L 时酶活力达到最大值（0.292U），但与对照组无明显差异。结果表明酵母细胞壁多糖浸浴处理能明显提高罗氏沼虾体内鳃中的 PPO 酶活力，且在 125.00mg/l 浓度时达到酶活力峰值。

表 2.3 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中酚氧化酶（PPO）活力的影响

酵母细胞壁多糖浓度 (mg/L)	酚氧化酶活力/U (n=3)			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0.00	0.437±0.031	0.303±0.018	0.298±0.033	0.272±0.028
31.25	0.367±0.029	0.422±0.036*	0.315±0.023	0.267±0.021
62.50	0.387±0.031	0.485±0.023**	0.347±0.046	0.292±0.033
125.00	0.448±0.046	0.827±0.050**	0.372±0.033	0.282±0.029
250.00	0.422±0.053	0.502±0.050*	0.337±0.024	0.277±0.033

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（ $P<0.05$ ）或极显著（ $P<0.01$ ）差异。

2.2.4 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中 SOD 的影响

由图 2.4 可知，罗氏沼虾 SOD 电泳图谱共检测出两条负带，且在心脏中酶活力表达最强烈，呈现两条酶带；其次是鳃，也出现了两条酶带；肝脏和肌肉最弱，只表达了一条酶带。说明不同组织中的 SOD 酶活性存在差异，具有明显的组织特异性。

不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理后，心脏组织中的 SOD-1 在浓度为 125.00mg/L 时颜色明显加深且酶带变宽，其余浓度时变化不明显，SOD-2 也无明显变化；鳃中也呈现了 SOD-1 和 SOD-2 两条酶带，其中 SOD-1 变化有一定的波动，在酵母细胞壁多糖浓度为 0.00mg/L 和 62.50mg/L 时颜色较深，在浓度为 31.25mg/L 和 125.00mg/L 时颜色较浅，在浓度为 250.00mg/L 时颜色最浅，但 SOD-2 则无明显的变化；肝脏和肌肉中都只表达了 SOD-2 一条酶带，且均随酵母细胞壁多糖浓度的升高无明显的变化，没有酶带数量的新增和缺失现象。

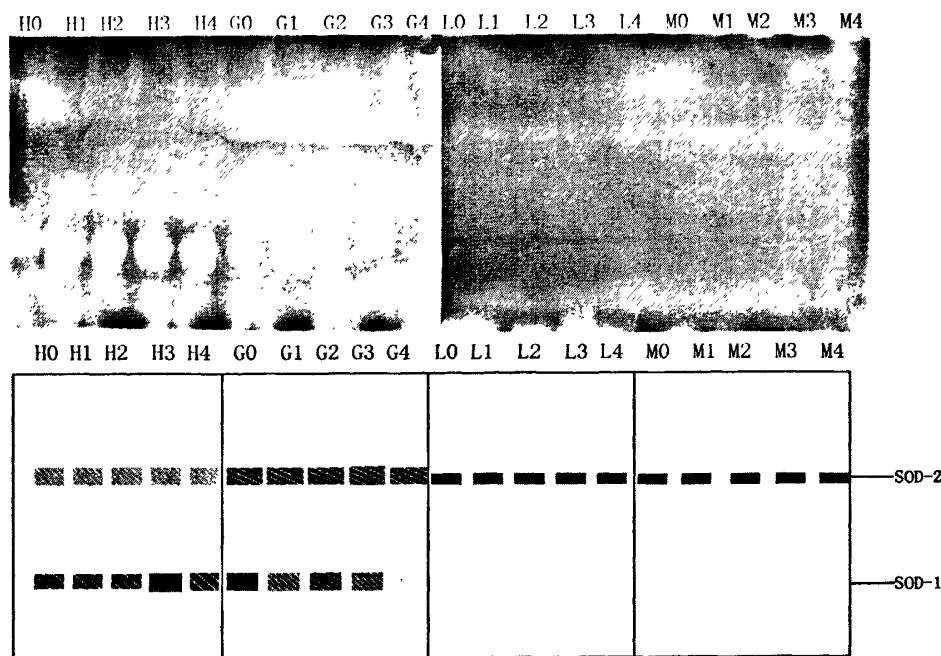


图 2.4 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴后罗氏沼虾 4 种组织中 SOD 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉；0、1、2、3、4 分别代表酵母细胞壁多糖浓度 0.00mg/L、31.25 mg/L、62.50mg/L、125.00mg/L 、250.00mg/L。

由表 2.4 可知，心脏组织中的 SOD 活力最强，肝脏和心脏中较弱，肌肉中最弱。不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理后，心脏和鳃组织中 SOD 酶活力变化较明显，肝脏和肌肉中酶活力均无明显的变化。心脏中的 SOD 酶活力先逐渐提高，在酵母壁多糖浓度为 125.00 mg/L 时达到了峰值 137.551 U/mg，与对照组具有显著性差异，随后在酵母壁多糖浓度为 250.00 mg/L 时，SOD 活力略有下降，但仍与对照组具有明显差异；鳃组织中 SOD 活力也先上升，在酵母壁多糖浓度为 62.50 mg/L 时达到最大值 67.982 U/mg，与对照组具有明显差异，之后酶活力开始下降，但没有出现显著性变化；肝脏组织中的 SOD 酶活力呈现逐渐上升的趋势，在酵母细胞壁多糖浓度为 250.00 mg/L 时达到最大值，但与对照组无明显差异；肌肉组织中的酶活力先上升，之后在酵母细胞壁多糖浓度为 62.50 mg/L 时略有下降，随后在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00 mg/L 时 SOD 酶活力又再次上升，但各实验组酶活力与对照组均无明显差异。结果表明酵母细胞壁多糖浸浴处理能明显提高罗氏沼虾体内心脏和鳃中的 SOD 活力，心脏中的 SOD 活力在 125.00mg/L 和 250.00mg/L 浓度时显著增强，而鳃中 SOD 活力是在 62.50mg/L 浓度时有明显增强。

表 2.4 不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴对罗氏沼虾 4 种组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的影响

酵母细胞壁多糖浓度 (mg/L)	超氧化物歧化酶活力 (U/mg±SD) (n=3)			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0.00	96.783±6.524	58.887±2.451	47.961±5.231	7.555±0.781
31.25	101.472±10.278	52.500±2.523	50.749±4.450	8.567±0.630
62.50	102.570±6.431	67.982±2.110*	54.718±3.463	6.235±0.539
125.00	137.551±9.570*	62.340±2.302	53.623±2.468	7.679±0.519
250.00	123.789±9.008*	55.002±4.614	56.593±4.785	7.703±0.679

注: SD 表示标准偏差; n 表示实验重复的次数. 同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著 ($P<0.05$)

或极显著 ($P<0.01$) 差异。

2.3 讨论

2.3.1 罗氏沼虾体内 4 种免疫相关同工酶的组织特异性

同工酶是来源于同一种系、机体或细胞的同一种酶, 具有不同的形式, 催化同一化学反应但化学组成不同的一组酶。本实验利用不同浓度的酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂对罗氏沼虾进行浸浴处理一定时间(120h)后观察虾体 4 种组织(心脏、肝脏、鳃和肌肉)中, 4 种免疫相关酶(ACP、POD、PPO 和 SOD)的活性变化。结果显示, ACP、POD、PPO 和 SOD 4 种免疫相关酶在所取得的 4 种组织中均有分布, 且不同组织各种酶的表达不同, 即此 4 种酶的表达具有明显的组织特异性。本实验表明, ACP、POD 和 PPO 在鳃和肝胰脏中的酶活性较高, 肌肉中最弱。这是因为鳃组织是甲壳动物进行呼吸和排泄的器官, 并且它还直接与外界水体环境接触, 最容易受到水质环境的影响及病害的损伤, 而肝胰脏在甲壳动物的消化、代谢、吸收以及解毒等过程中起到重要作用, 因此, 免疫相关同工酶活性较强烈。肌肉组织的功能较单一, 所以酶活力表达较弱。但 SOD 在心脏中的表达最强列, 这是因为 SOD 主要功能是清除甲壳动物体内超氧阴离子自由基(O_2^-), 而 O_2^- 大部分来源于呼吸细胞或者某些细胞器(如线粒体呼吸链作用等)^[57]。心脏中又含有较多的线粒体, 因此其 SOD 活性的表达最强列。

2.3.2 酵母细胞壁多糖浸浴后沼虾体内免疫相关同工酶的变化

ACP 酶谱和酶活力测定结果均表明不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理能明显提高罗氏沼虾体内鳃、肝脏和心脏组织中的 ACP 活力, 并在 125.00mg/L 浓度时作用效果最显著。由 ACP 同工酶图谱可知, 随着酵母细胞壁多糖浓度的提

高,心脏、肝脏和鳃组织中的酶活性变化最明显,且均在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00mg/L 时表达最强烈,酶带的颜色最深。ACP 酶活性测定结果也显示在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00mg/L 时,心脏、鳃和肝脏组织中的酶活力与对照组呈现极显著性或显著性差异,酶活力分别为 72.419mg/L、77.669 mg/L 和 182.762 mg/L。说明酵母细胞壁多糖在浸浴浓度达 125.00mg/L 时能明显提高虾体内 ACP 活力,免疫效果较好。肌肉组织中的 ACP 活性无明显变化,酶活性较低,酶谱表达也较弱,这主要与肌肉组织的功能性相关。ACP 是一种磷酸单酯酶,对磷酸单酯及磷酸基团的转移具有重要作用^[58,59],是动物体内的解毒体系。用酵母细胞壁多糖免疫激活剂浸浴罗氏沼虾能明显的提高下虾体内 ACP 含量,达到了一定的免疫作用。但这种免疫刺激作用不是无限制的提高, Soderhall K 和 Hall L^[60]的研究也发现,低剂量的脂多糖对龙虾血细胞内的酚氧化酶活力有提高作用,但高剂量的脂多糖则会有抑制性作用。这一点在本实验中也得到认证,在酵母壁多糖浓度为 250.00mg/L 时,除鳃中的 ACP 酶活力仍然明显高于对照组外,心脏和肝脏组织中的 ACP 酶活力均又恢复到对照组水平。

由 POD 酶谱可知,随着酵母细胞壁多糖浓度的提高,鳃组织中的 POD 酶活力变化最明显,在酵母细胞壁多糖浓度为 62.50mg/L 和 125.00mg/L 时酶带颜色加深。酶活力测定也显示在酵母细胞壁多糖浓度为 62.50mg/L 和 125.00mg/L 时鳃组织中的 POD 活力显著高于对照组,分别为 19.135Eu/(g·min) 和 20.826Eu/(g·min)。过氧化物酶是一类氧化还原酶类,以铁卟啉为辅基,能清除生物体内酚类和胺类化合物。Sung^[10]等也曾报道采用从酵母中提取的 β -1, 3 葡聚糖的溶液浸泡斑节对虾 (*Penaeus monodon*),结果证明在处理 18 天内,供试虾体内的 POD 活性有明显提高。这说明酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾 POD 具有明显的免疫激活作用。本实验证明在浸浴浓度为 62.50mg/L 和 125.00mg/L 时虾体内 POD 活力有明显提高,且在 125.00mg/L 时,酶活力达到峰值,沼虾免疫能力明显增强。

由 PPO 同工酶酶谱可知,随着酵母细胞壁多糖浓度的提高,鳃组织中的变化最明显,各实验组均与对照组有明显差异。酶活力测定也显示了同样的结果,酶活力先呈逐渐上升的趋势,在酵母细胞壁多糖浓度达 125.00mg/L 时,达到最大值 0.827U,与对照组具有极显著性差异,随后酶活力又开始下降,但与对照组差异仍显著。这说明酵母细胞壁多糖能刺激鳃组织中的 PPO 的表达。PPO 是

一种含铜质体的广泛存在于自然界中的金属酶类。有活性的 PPO 可以使生物体内相关底物由酚变成醌,醌自发生成黑色素沉积在外来侵袭物上,将外来病原菌隔离开来,从而起到免疫效果^[61-63]。Suphenthari^[64]等人也观察到用酵母葡聚糖对虎虾 (*Penaeus monodon*) 分别进行体内和体外刺激以后,能够显著增强血淋巴的酚氧化酶活性。本实验也表明,对罗氏沼虾浸浴浓度为 125.00mg/L 的酵母细胞壁多糖可以明显提高虾鳃组织中的 PPO 活力,从而使虾体的免疫力增强。

由 SOD 酶谱可知,随着酵母细胞壁多糖浓度的提高,心脏和鳃组织中的变化较明显,均在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00 mg/L 时,酶带颜色加深。肝脏和肌肉中的同工酶酶谱无明显变化。SOD 酶活力测定也显示了同样的结果,随着酵母细胞壁多糖浓度的提高,心脏组织中的 SOD 活力先呈上升的趋势,在酵母细胞壁多糖浓度为 125.00 mg/L 时达到最大值 137.551 U/mg,与对照组差异显著。随后在酵母细胞壁多糖浓度为 250.00 mg/L 时,酶活力略有下降,但仍与对照组具有显著性差异。鳃组织中的 SOD 活力在酵母细胞壁多糖浓度为 62.50 mg/L 时达到最大值,与对照组差异显著,随后酶活力又恢复到对照组水平,这可能是由于鳃组织直接与水体中的免疫多糖接触,因此在较低浓度时即产生了免疫刺激作用。但当酵母细胞壁多糖浓度逐渐增大时,过高的酵母细胞壁多糖又对虾体内的免疫系统产生了一定的抑制作用。Scholz^[45]也认为如果长期投喂葡聚糖,剂量是一个需要考虑的重要问题。因此,在使用含有 β -葡聚糖的酵母细胞壁多糖时也要注意其有效作用剂量,确定最佳的药物处理浓度。本实验证明,用 125.00 mg/L 的酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾能使其心脏组织中的 SOD 活力明显提高。

2.3.3 小结

综上所述,实验结果表明不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴处理能明显提高罗氏沼虾体内 4 种免疫相关酶的活力。尤其在鳃组织中的变化最显著,其内 4 种免疫相关酶活性均有明显的提高,尤其在浸浴浓度为 125.00mg/l 时,ACP、PPO 和 POD 活力均达到峰值,且与相应对照组具有极显著或显著性差异。这可能是由于鳃直接与外界水体中的药物相接触,因此受到的免疫刺激作用较强烈。肝脏中的 ACP 活力也在浸浴浓度为 125.00mg/L 时出现了峰值,相当于对照组的 1.25 倍;心脏中的 ACP 和 SOD 也在浸浴浓度为 125.00mg/L 时出现了明显增强;但肌肉组织中的 4 种免疫相关酶活力均无明显变化。这可能是由于浸浴这种给药方法对不同组织的免疫激活程度有所不同的缘故。因此,本实验认为以酵母细胞壁

多糖为免疫促进剂,采用浸浴的给药方法对罗氏沼虾进行处理,可以明显提高罗氏沼虾的免疫功能。且当酵母细胞壁多糖浸浴浓度为 125.00 mg/L 时,免疫增强效果最佳。然而, Campa-Cordova^[65]等认为浓度为 0.5mg/ml 的葡聚糖浸泡 10-12g 的南美白对虾效果较好,能使其血细胞中的 SOD 活性显著增强。Song 也认为用 0.5mg/mL β -葡聚糖浸浴 PL15 斑节对虾幼体会使对虾的抗运输、抗捕捉以及抗氨氮能力有明显的增强^[33]。这可能是由于酵母细胞壁多糖中还含有其他免疫成分的缘故,例如甘露聚糖,它能吸附病原菌,干扰肠道病原菌的定殖,从而使动物肠道病原微生物的数量降低^[66]。有报道证实,甘露聚糖能使鱼的嗜中性细胞活性增强^[67]。并且不同种类的虾可能对外界给予的免疫激活的敏感程度也会不同。

第三章 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响

罗氏沼虾又名淡水长腿大虾、马来大虾、金线虾(台湾),具有“淡水虾王”的称号。并且罗氏沼虾还是一种高蛋白的营养水产品,每百克虾肉内含有蛋白质20.6克,脂肪0.6g,多种维生素以及人体所必须的微量元素。在成熟罗氏沼虾的头胸甲壳内具有类似于蟹黄的鲜美之味的生殖腺。因此研究罗氏沼虾的免疫系统,增强其个体的抵抗力,从而提高生产具有较高的经济价值。然而,酵母细胞壁多糖在水产养殖中的应用会受到很多因素的影响。有研究表明用酵母细胞壁多糖、肽聚糖等多糖类免疫促进剂对水产生物进行处理时,如果处理时间较长,药物就有可能失效,甚至会产生副作用。Miyazano和Matsuo^[43]用肽聚糖处理虹鳟鱼28d后,虹鳟鱼对鳃弧菌(*V. anguillarum*)的抵抗能力明显提高,但当处理时间达到56d时,虹鳟鱼的免疫力则未增强。导致此种现象的生理机制很有可能与机体的负反馈调节系统有关,它能使生物的免疫系统恢复到原来的状态。因此,在使用酵母细胞壁多糖等免疫促进剂时要注意其有效作用期限,确定最佳处理时间。然而,有关酵母细胞壁多糖在罗氏沼虾生产养殖中的最佳药物浸浴时间未见报道,因此,本研究利用125.00 mg/L的酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂对罗氏沼虾进行浸浴处理,分别在0h, 48h, 96h, 144h和196h取虾体心脏、肝脏、鳃和肌肉组织,测定其ACP、POD、PPO和SOD的活性并结合同工酶酶谱分析来探讨酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾最佳处理时间及维持的时效,为酵母细胞壁多糖在虾类养殖生产实践中的应用提供参考。

3.1 材料与方法

3.1.1 实验虾

2010年8月份从上海市冠生园路徐汇区漕河泾菜市场购买个体大小均一并健康(长度约为8-10cm、重量约为10-15克)的罗氏沼虾,分养于聚乙烯水簇箱(长×宽×高=58cm×43cm×39cm)中,每个聚乙烯水簇箱放养沼虾20尾。

3.1.2 酵母细胞壁多糖

酵母细胞壁多糖由湖北省安琪酵母有限公司提供。该产品中含有活性成分 β -

葡聚糖为20%， α -甘露聚糖肽 $\geq 20\%$ ，肽类及蛋白质 $\geq 30\%$ ，几丁质 $\geq 2.0\%$ 。

3.1.3 主要试剂

与第二章所需试剂相同。

3.1.4 实验仪器

与第二章所需仪器相同。

3.1.5 实验虾不同时间浸浴处理

将实验虾在实验室暂养两天后，加入 60 L 含有酵母细胞壁多糖浓度为 125.00mg/L 的水，每天 7:30 和 17:30 各投饵一次，换水 1/3（换入新水中含有同样浓度的酵母细胞壁多糖），用虹吸法去除多余饵料和排泄物。水温保持在 20~25℃之间，pH 为 7.3 ± 0.2 ，自然光照，连续充气。

3.1.6 实验样品制备

粗酶液：每隔 48h 随机抽取 10 尾沼虾，迅速放入冰盘解剖，取虾体的心脏，肝胰脏，肌肉和鳃 4 种组织，用滤纸吸取组织液后称重，以 1:3 (W/V) 的比例加入预冷的磷酸缓冲液 (0.1mol/L PH7.0 PBS)，于冰浴中用玻璃匀浆器匀浆。匀浆以后 4℃条件下经 12000r/min 离心 30 min 取上清液制成粗酶液。

电泳待测酶液：从每种组织的粗酶液中取出 200ul 与电泳上样缓冲液（取 2ml 的浓缩胶缓冲液，1ml 87%的甘油和少量蔗糖及 0.1 溴酚蓝混匀）按 1:1 (V/V) 充分混匀后分装，作为电泳待测酶液置于-20℃冰箱中备用。

酶活力待测酶液：其余粗酶液按 2:3 (V/V) 的比例加入预冷的磷酸缓冲液 (0.1mol/L PH7.0 PBS)，充分混匀后分装，作为酶活力待测酶液置于-20℃冰箱中备用。

3.1.7 同工酶电泳

与第二章实验方法相同。

3.1.8 酶活力测定

与第二章实验方法相同。

3.2 结果与分析

3.2.1 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中 ACP 的影响

经酵母细胞壁多糖浸浴后，每隔 48h 测定虾体内各组织中 ACP 同工酶电泳酶谱的变化，结果如图 3.1 所示。鳃和肌肉组织中的 ACP 酶带数均保持不变，

变化主要表现在酶带颜色深浅上;而肝脏和心脏组织均新增一条酶带 ACP-4。具体表现为随着药物浸浴时间的延长,心脏组织中的 ACP-2 酶带颜色均明显加深,且在浸浴时间为 144h 时新增一条酶带 ACP-4,该新增酶带在 192h 仍出现,但颜色略有变浅。鳃中有 ACP-2,3,4 三条酶带,其中 ACP-2 酶带在 144h 和 196h 时酶带颜色明显加深,且酶带变宽;ACP-3 随着浸浴时间的延长,酶带颜色逐渐加深,在 192h 达到最深;ACP-4 在浸浴时间达为 144h 后,酶带颜色略有加深,其余时间无明显变化。肝脏在 144h 时中新增一条颜色很深的酶带 ACP-4,该酶带随着浸浴时间延长至 196h 时又消失,而其原有 ACP-1 酶带,在 96h 颜色略有变浅,而后在 144h 时又明显加深。肌肉组织中共表达两条酶带 (ACP-1,3),其中 ACP-3 在浸浴时间为 144h 时,酶带颜色明显加深,而后又变浅。总之,随着浸浴时间的延长,4 种组织中的 ACP 表达均有增强,表现为酶带数增加或颜色变深,尤其是浸浴时间为 144h 时最明显;其中鳃和肝脏组织中的 ACP 活力增强的最明显,其次是心脏组织,肌肉中最弱。

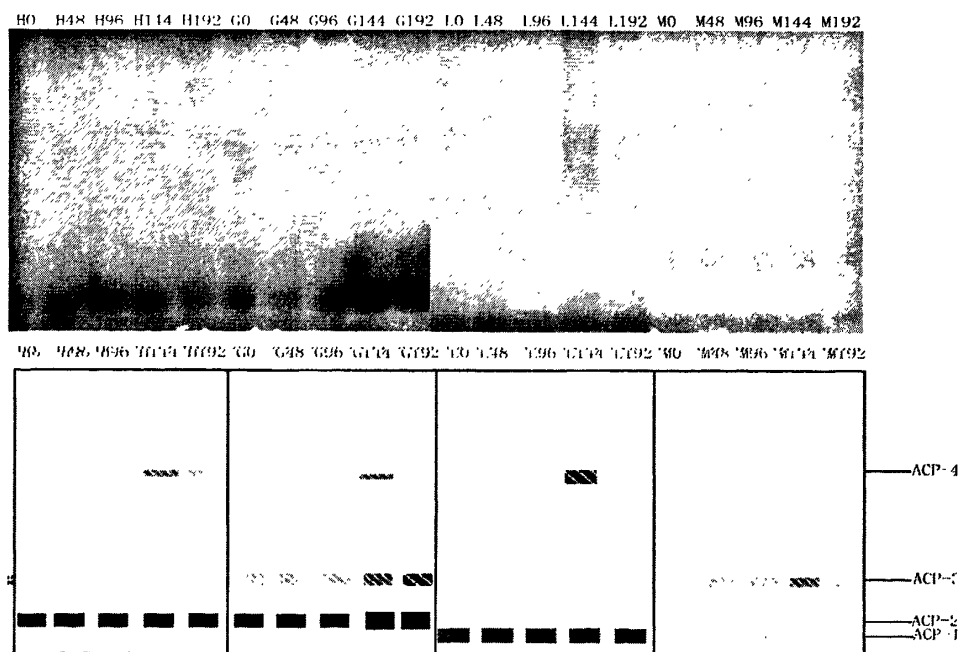


图 3.1 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间后罗氏沼虾 4 种组织 ACP 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉;0、48、96、144、192 分别代表浸浴时间为 0h、48h、96h、144h 和 192h。

经酵母细胞壁多糖浸浴 192h 后,每隔 48h 测定虾体内 ACP 活力的变化,如表 3.1 所示。4 种组织中的 ACP 活力均在浸浴时间达 144h 后开始出现显著性增

强。心脏和肌肉组中的 ACP 活力均在浸浴时间达到 144h 后出现峰值，分别为 72.955 U/L 和 44.244 U/L，且均与对照组具有显著性差异，随后酶活力都略有下降，但与对照组差异性不显著；鳃组织中酶活力先逐渐上升，在浸浴时间达到 144h 达到峰值 92.003U/L,随后在 192h 时酶活力又略有降低,但浸浴时间达 144h 和 192h 时酶活力均明显高于对照组水平；肝脏组织中的 ACP 活力只在浸浴时间达到 144h 时，达到最大值 215.930U/L,且与对照组具有极显著性差异，其余浸浴时间处理组均与对照组无明显差异。即在浸浴时间达 144h 后，虾体内 4 种组织中的 ACP 酶活性均有明显的提高，且鳃中高水平的 ACP 活力维持的时间最长，直到 192h 后酶活力仍显著高于对照组。

表 3.1 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中酸性磷酸酶（ACP）活力的影响

浸浴时间 (H)	酸性磷酸酶活力/U•L-1 ±SD(n=3)			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0	62.778±3.889	82.790±4.340	196.218±3.857	37.924±2.007
48	63.528±3.861	84.182±5.284	189.362±4.515	39.102±2.916
96	64.706±3.655	89.539±3.406	193.219±8.560	40.709±2.280
144	72.955±2.756*	92.003±2.571*	215.930±2.969**	44.244±2.412*
192	68.027±4.194	91.681±2.892*	203.931±7.413	39.852±1.473

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数。同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（P<0.05）或极显著（P<0.01）差异。

3.2.2 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中 POD 的影响

经酵母细胞壁多糖浸浴处理后，每隔 48h 测定虾体内 POD 电泳酶谱的变化，如图 3.2 所示。鳃和肝脏中仍呈现两条酶带，而心脏和肌肉中也仍只表达一条酶带，即没有酶带数的新增和缺失现象。

随着药物浸浴时间的延长，心脏中的 POD-2 酶带在 96h 时，略有加强，其余时间均无明显变化；鳃中有 POD-1 和 POD-2 两条酶带，在浸浴时间达 144h 和 192h 时，两条酶带颜色明显加深；肝脏中也呈现了两条酶带（POD-2,3）,其中 POD-2 随着浸浴时间的延长，酶带颜色逐渐加深，在 192h 时达到最深，POD-3 则无明显变化。肌肉组织中仅出现 POD-2 一条酶带，随着浸浴时间的延长，酶带颜色先略有加深，而后当浸浴时间达到 192h 时，酶带颜色明显变浅。总之，随着浸浴时间的延长，4 种组织中的 POD 表达均有一定的变化，主要表现在酶

带的颜色有所变深,其中鳃组织中的酶活力增加最明显;其次是心脏和肝脏组织;肌肉组织中最弱。

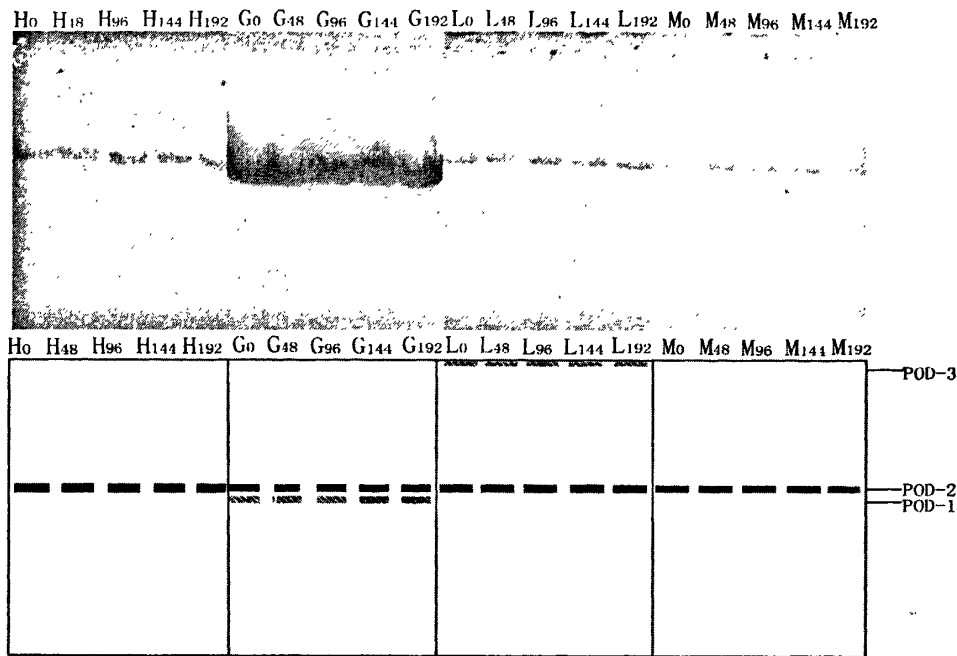


图 3.2 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间后罗氏沼虾 4 种组织 POD 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉; 0、48、96、144、192 分别代表浸浴时间为 0h、48h、96h、144h 和 192h。

经酵母细胞壁多糖浸浴处理后,每隔 48h 测定虾体内 POD 活力的变化,如表 3.2 所示.。随着药物浸浴时间的延长,鳃和肝脏中的 POD 活力变化较明显,心脏和肌肉中 POD 活力变化较弱。鳃和肝脏中的 POD 活力均在浸浴时间达到 144h 和 192h 时有显著性提高,且均在浸浴时间为 144h 时达到最大值,分别为 19.135 Eu/ (g.min) 和 16.643 Eu/ (g.min) ; 心脏组织和肌肉组织中的酶活力虽也有上升的现象,但均与对照组无明显差异。即用 125.00mg/L 的酵母细胞壁多糖浸浴沼虾 144h 后,能明显提高沼虾鳃和肝脏组织中的 POD 活力。且 196h 后,两组织中的酶活力仍维持较高水平,与对照组差异显著,其它组织中 POD 活力变化不明显。

表 3.2 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中过氧化物酶（POD）活力的影响

浸浴时间 (H)	过氧化物酶活力 (Eu/ (g.min) ±SD) (n=9)			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0	7.654±0.816	15.486±0.963	14.329±0.672	1.157±0.154
48	7.387±0.408	15.575±0.672	14.774±0.858	1.424±0.154
96	9.256±0.672	17.266±0.556	15.575±1.079	1.246±0.408
144	8.277±0.534	19.135±0.672*	16.643±0.816*	1.513±0.154
192	8.188±0.556	18.690±0.706*	16.554±0.801*	1.246±0.154

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（ $P<0.05$ ）或极显著（ $P<0.01$ ）差异。

3.2.3 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中 PPO 的影响

经酵母细胞壁多糖浸浴处理后，每隔 48h 测定虾体内 PPO 电泳酶谱的变化，如图 3.3 所示。鳃组织呈现两条酶带，而其他组织均只表达了一条酶带，没有酶带的新增和缺失现象。

随着药物浸浴时间的延长，心脏、肝脏和肌肉组织中的 POD-2 均无明显变化；在浸浴时间达 96h 和 144h 时，鳃中仅 PPO-2 酶带颜色变深，到 192h 时该酶带颜色又变浅。总之，随着浸浴时间达 96h 后，鳃组织中的 POD 活性有明显提高，但当浸浴时间达到 192h 时，活性又下降至与对照组相近。

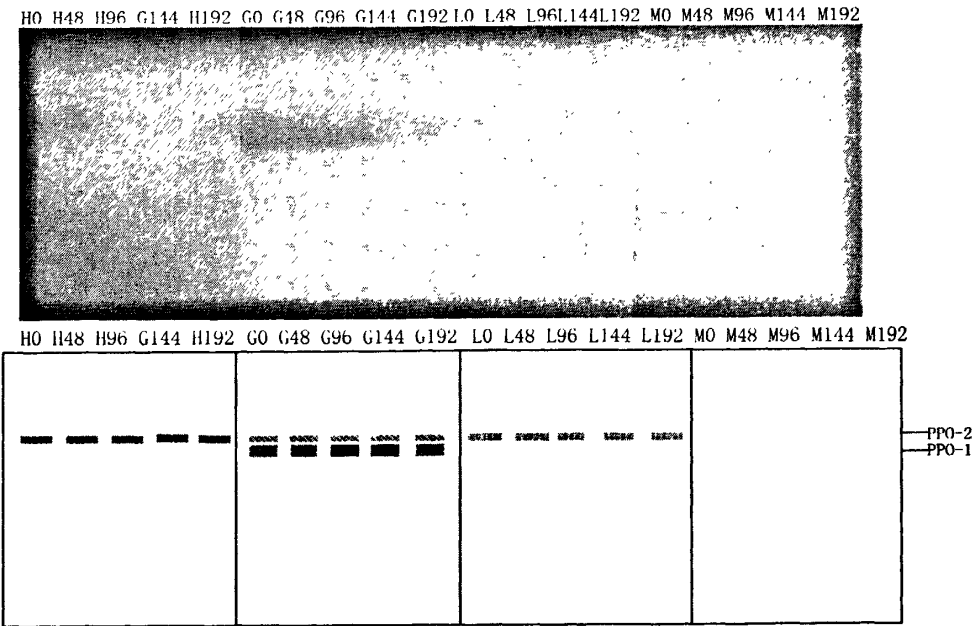


图 3.3 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中 PPO 电泳图谱及其模式图

H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉；0、48、96、144、192 分别代表浸浴时间为 0h、48h、96h、144h 和 192h。

经酵母细胞壁多糖浸浴 192h 后，每隔 48h 测定虾体内 PPO 活力的变化，如

表 3.3 所示。随着药物浸浴时间的延长,鳃和肝脏中的 PPO 活力变化较显著,心脏和肌肉组织中的 PPO 活力与对照组相比无明显变化。心脏和肌肉组织中的酶活力虽也有提高的现象,但与对照组差异均不显著。鳃和肝脏组织中的 PPO 活力变化趋势相近,酶活力均先逐渐增强,在浸浴时间为 96h 时达到峰值,分别为 0.952U 和 0.468U,均与相应的对照组具有显著性差异,随后在浸浴时间达 144h 时,酶活力都略有下降,但与相应对照组仍有明显提高,不过在浸浴时间达 192h 后鳃和肝脏组织中的 PPO 酶活力都降至相应对照组水平。即用 125.00mg/l 的酵母细胞壁多糖浸浴沼虾 96h 和 144h 后均能明显提高鳃和肝脏中的 PPO 活力,但浸浴时间延长到 192h 后两组织中的 PPO 酶活力则都没有提高。

表 3.3 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中酚氧化酶 (PPO) 活力的影响				
浸浴时间 (H)	酚氧化酶活力/U (n=9)			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0	0.455±0.015	0.577±0.031	0.295±0.013	0.315±0.044
48	0.482±0.096	0.632±0.073	0.368±0.037	0.270±0.028
96	0.513±0.051	0.952±0.094*	0.468±0.033*	0.290±0.033
144	0.500±0.053	0.927±0.071*	0.448±0.029*	0.305±0.015
192	0.413±0.043	0.547±0.024	0.287±0.023	0.303±0.029

注: SD 表示标准偏差; n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著 (P<0.05) 或极显著 (P<0.01) 差异。

3.2.4 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中 SOD 的影响

经酵母细胞壁多糖浸浴处理后,每隔 48h 测定虾体内 SOD 电泳酶谱的变化,如图 3.4 所示,各组织中的 SOD 酶带均没有新增和缺失现象。但是随着药物浸浴时间的延长,酶带颜色及宽度出现了一定的变化。心脏中的 SOD-1 酶带颜色逐渐加深,在浸浴时间为 144h 时达到最深,且酶带变宽,但随后在 192h 时酶带宽度又略有变窄,SOD-2 酶带颜色及宽度均无明显变化;鳃中有 SOD-1 和 SOD-2 两条酶带,其中 SOD-1 在浸浴时间为 48h 时颜色略有变浅,其它浸浴时间酶带颜色和宽度均无显著的变化,SOD-2 也无明显的变化。肝脏和肌肉中仅表达了 SOD-2 一条酶带,肝脏中的 SOD-1 在 144h 和 192h 时酶带略有变宽,其余时间无明显变化,肌肉中的 SOD-1 亦无明显的变化。总之,随着浸浴时间的延长,心脏组织中的 SOD 酶谱表达变化最明显,尤其在浸浴时间达 144h 后,酶活力提

高最明显，表现为其酶带明显变宽且颜色变深。

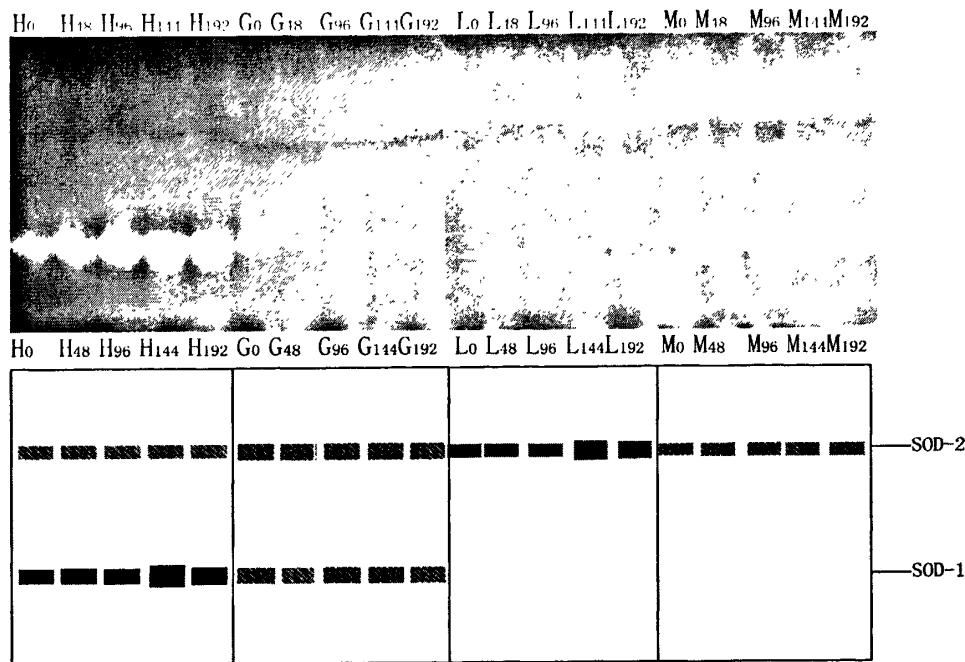


图 3.4 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间后罗氏沼虾 4 种组织中 SOD 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉；0、48、96、144、192 分别代表浸浴时间为 0h、48h、96h、144h 和 192h。

经酵母细胞壁多糖浸浴 192h 后，每隔 48h 测定虾体内 POD 活力的变化，如表 3.4 所示。随着药物浸浴时间的延长，心脏组织中的 SOD 变化最明显，其他组织中均无明显变化。心脏组织中的酶活力先逐渐上升，在浸浴时间达 96h 后开始显著高于对照组 ($P<0.05$)，至 144h 时酶活力达到峰值 (157.351 U/mg, $P<0.01$)，192h 后酶活力略有下降，但仍显著高于对照组；鳃，肝脏和肌肉组织酶活力虽然也有上升的趋势，但均与相应对照组差异不显著。即用 125.00mg/L 的酵母细胞壁多糖浸浴沼虾 96h、144h 和 192h 后均能明显提高沼虾心脏组织中 SOD 活力，且在 144h 后 SOD 活力达到峰值，相当于与对照组的 1.44 倍。其它组织中 SOD 活力均无明显变化。

表 3.4 酵母细胞壁多糖浸浴不同时间对罗氏沼虾 4 种组织中超氧化物歧化酶（SOD）活力的影响

浸浴时间 超氧化物歧化酶活力（U/mg±SD）(n=3)

(H)	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0	109.348±5.849	65.582±4.443	53.803±4.478	8.094±0.570
48	119.000±4.506	58.618±3.562	53.521±2.156	8.719±0.840
96	147.880±13.030*	64.620±3.057	55.643±2.257	6.897±0.611
144	157.351±6.855**	67.634±3.241	58.642±3.766	7.090±0.646
192	154.161±11.023*	63.742±2.705	55.902±2.034	7.226±0.472

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（ $P<0.05$ ）或极显著（ $P<0.01$ ）差异。

3.3 讨论

酵母细胞壁多糖是一类真菌多糖，主要由酵母菌细胞壁破碎后酶解，再经分离提纯等一系列工艺精制而成的，呈浅黄色的粉状物。有研究证明酵母细胞壁有三层：外层为蛋白质结合物和甘露糖；中间层为 β -(1,3)和 β -(1,6)葡聚糖；内层为几丁质。酵母细胞壁多糖具有许多功能，如能吸附病原菌，提高巨噬细胞的活性，加快虾免疫器官发育，增强淋巴细胞数量等，既可增强非特异性免疫，又能激发机体体液免疫。然而 Bagin M^[68]等认为在使用酵母 β -葡聚糖作为免疫促进剂时要注意其有效作用期限，确定最佳处理时间。因此研究酵母细胞壁多糖在罗氏沼虾生产养殖中的最佳药物浸浴时间是很有必要的。

酸性磷酸酶(ACP)，它可以催化磷酸基团的转移及磷酸单酯的水解反应，加快物质的摄取及转运^[69,70]，有研究认为 ACP 在甲壳动物的血液及血细胞中都担负着机体防病抗病的重要功能。本实验研究发现，在浸浴时间达 144h 后，虾体内 4 种组织中的 ACP 酶活性均有明显的提高，主要表现在酶带数目的新增和原有酶带颜色的加深，如肝脏和心脏组织均新增了一条 ACP-4 酶带，但当浸浴时间达到 192h 后，除了鳃组织中的酶活力仍维持较高水平外，其余各组织中的酶活力均有下降，但与对照组无明显差异。这可能与机体的负反馈调节系统有关，它能使生物的免疫系统恢复到原来的状态。Miyazano 和 Matsuo^[71]的报道也显示了同样的规律。本实验结果表明，酵母细胞壁多糖浸浴时间达 144h 能明显提高虾体内各组织中 ACP 酶活力，且鳃中高水平 ACP 活力维持的时间最长。

过氧化物酶（POD），是一类氧化还原酶类，能清除生物体内活性氧，减少自由基对细胞的损伤，从而提高机体的解毒和抗病能力。本实验结果表明，用

125.00mg/L 的酵母细胞壁多糖浸浴沼虾 144h 后, 鳃和肝脏组织中 POD 活力明显提高, 分别达到峰值 19.135 Eu/(g.min) 和 16.643 Eu/(g.min), 主要表现在原有酶带颜色明显加深。且浸浴 196h 后, 两组织中的酶活力仍维持较高水平, 与对照组差异依然显著。但肌肉和心脏组织中 POD 酶活力变化不明显, 这可能是由于浸浴的处理方法对两组织的激活作用较弱的缘故。

在甲壳动物非特异性免疫系统中, 酚氧化酶系统起着重要作用。甲壳动物血清中含有 β -1,3 葡聚糖结合蛋白 (BGBP), 当 β -1,3 葡聚糖与受体结合后连接到血淋巴颗粒细胞膜表面, 使颗粒细胞释放出能激活酚氧化酶原引发级联放大反应的丝氨酸, 进而使酶原转化为酚氧化酶, 有活性的酚氧化酶进而产生大量的黑色素, 并且免疫反映中还会产生多种活性物质, 这些活性物质又会通过多种途径和方式参与机体的防御反应^[72]。本实验中, 通过 PPO 同工酶酶谱可知, 随着浸泡时间的延长, 鳃组织中的酶带颜色略有变化, 其余组织均无明显变化。酶活力测定结果显示鳃和肝脏组织中的酶活力变化较显著, 在浸浴时间达到 96h 和 144h 时, 酶活力水平明显提高, 与对照组差异显著。肌肉和心脏组织中的酶活力变化不明显。即浸浴时间达 96h 和 144h 虾体内的 PPO 酶活水平会有明显提高, 但浸浴 192h 后 PPO 活力则没有提高。这可能是由于沼虾的负反馈调节系统使生物的免疫水平恢复到原来的状态^[43]。

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 是一类重要的抗氧化酶, 能够清除生物体在进行新陈代谢的过程中产生的超氧化物^[73,74]。本实验研究结果表明, 心脏组织中的 SOD 活力在浸浴时间达到 96h 后, 均有明显的提高, 酶带颜色明显加深, 但无酶带的新增或缺失现象, 且酶活力表显示浸浴 144h 时酶活力达到峰值 157.351 U/mg, 相当于对照组的 1.44 倍, 与对照组具有极显著性差异, 且浸浴时间延长到 192h 后, 酶活力仍维持较高水平, 依然与对照组具有显著性差异。其余各组织中的酶活力均无明显变化。即酵母细胞壁多糖能刺激虾体内 SOD 的产生, 这与国外学者 Campa-Cr6dova A I^[75]的研究结果相一致, 并且本实验认为浸浴时间达 144h, 能使虾体内 SOD 活力达到最高。

综上所述, 利用酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂对罗氏沼虾进行浸浴处理, 结果表明在浸浴时间达 96 h 时, 罗氏沼虾体内的免疫功能即有明显增强, 且在 144h 时各组织的免疫增强效果最显著, 但浸浴时间延长到 196h 后, 心脏和肝脏

组织中的 ACP 以及鳃和肝脏组织中的 PPO 活力均恢复到对照组水平。这说明酵母细胞壁多糖浸浴效果与时间并不存在直线关系,导致这种现象的生理机制尚不明了,很可能与生物机体的负反馈调节系统有关。因此本实验认为酵母细胞壁多糖浸浴的有效作用期限为 144h,建议水产养殖或实验研究中浸浴时间控制在 144h 效果最佳。

第四章 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响

疾病作为养殖业的棘手问题,一直困扰着我国水产动物的养殖。高密度的养殖条件下,难免会存在大量的病原物质,但对整个水体进行全面的消毒是难于做到的^[76-77]。因此水体中的病原细菌等就会乘隙而入,使虾病爆发。最初,人们通过降低单位水体的虾养殖量,然而这种方法提高了经济成本,并不划算。还使用过抗生素来进行病发后的治疗^[78-79],此种方法虽短期内很见效,但却有很强烈的负面效应。而使用低量的化学试剂如福尔马林、氯等对病原根本不起作用^[76,79]。因为,能杀害病原的试剂量对养殖生物幼体也是有致命作用的。因此,世界各国开始利用疫苗或从微生物中提取些免疫增强物质^[80-84]来刺激水产生物的免疫系统,以其达到防病治病的目的。目前这些免疫增强物质的使用方法主要分为浸浴、注射和投喂3种,但不同的对象,不同的给药方法会带来不同的结果。Selvaraj^[85]等利用 β -葡聚糖对对鲤(*Cyprinus carpio*)进行注射、浸浴和口服处理1-5d后,测定 β -葡聚糖对对鲤超氧阴离子生成的影响,发现只有注射方式作用明显。许多报道认为,采用注射的给药方法能有效的增强白细胞功能,提高抗病毒能力。李红权采用注射方式比较香菇多糖、灰树花多糖和赤芝多糖对日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)和日本对虾(*Penaeus japonicus*)的效果,结果3种多糖都具有明显的免疫刺激作用。

由湖北省安琪酵母有限公司生产的酵母细胞壁多糖已被证明是一种能够诱导激活水产动物非特异性免疫反应的物质^[86]。然而,对罗氏沼虾腹部注射酵母细胞壁多糖是否能对其免疫应答具有调理作用,至今未见报道。因此本实验利用不同浓度(1.0%、2.0%和3.0%)的酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂对罗氏沼虾进行腹腔注射处理,72h后取虾心脏、肝脏、鳃和肌肉组织,测定其ACP、POD、PPO和SOD的活性并结合电泳酶谱来探讨酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾免疫系统的影响,旨在为酵母细胞壁多糖在生产实践中的应用提供数据参考。

4.1 材料与方法

4.1.1 实验虾

2010 年 8 月底从上海市冠生园路徐汇区漕河泾菜市场购个体大小均一并买健康(长度约为 8-10cm、重量约为 10-15 克)的罗氏沼虾,分养于聚乙烯水簇箱(长×宽×高=58cm×43cm×39cm)中,每个聚乙烯水簇箱放养沼虾 20 尾。

4.1.2 酵母细胞壁多糖

本实验免疫多糖由湖北省安琪酵母有限公司提供。该产品中含有活性成分 β -葡聚糖为 20%, α -甘露聚糖肽 $\geq$ 20%, 肽类及蛋白质 $\geq$ 30%, 几丁质 $\geq$ 2.0%。用生理盐水配制浓度为 1.0%、2.0% 和 3.0% 三种浓度的免疫多糖溶液, 灭菌后备用。

4.1.3 主要试剂

与第二章所需试剂相同。

4.1.4 实验仪器

与第二章所需仪器相同。

4.1.5 实验虾不同时间注射处理

将实验虾在实验室暂养两天后, 将虾分成 4 组, 采用腹部体腔注射的方法, 对四组虾分别注射浓度为 0.0%、1.0%、2.0% 和 3.0% 的酵母细胞壁多糖溶液 0.1ml/尾^[87], 每天 8:00 和 17:00 各投饵一次, 换水 1/3, 用虹吸法去除排泄物 and 多余饵料。水温为 23℃ 左右, 自然光照, 用充气泵连续充气。

4.1.6 实验样品制备

粗酶液: 经注射处理 72h 后, 从每个处理组中随意抽取 10 尾沼虾, 迅速放入冰盘解剖, 取虾体的心脏、肝胰脏、肌肉和鳃 4 种组织, 用滤纸吸取组织液后称重, 以 1:3 (W/V) 的比例加入预冷的 pH7.0 的磷酸缓冲液 (0.1mol/L PBS), 置于冰块中用匀浆器匀浆。匀浆后于 4℃ 条件下以 12000r/min 离心 30 min, 之后取上清液作为粗酶液。

电泳待测粗酶液: 从每种组织的粗酶液中取出 200ul 与电泳上样缓冲液 (取 2ml 的浓缩胶缓冲液, 1ml 87% 的甘油和少量蔗糖及 0.1 溴酚蓝混匀) 按 1:1 (V/V) 充分混匀后分装, 作为电泳待测酶液置于 -20℃ 冰箱中备用。

酶活力待测粗酶液: 其余粗酶液按 2:3 (V/V) 的比例加入预冷的磷酸缓冲液 (0.1mol/L pH7.0 PBS), 充分混匀后分装, 作为酶活力待测酶液置于 -20℃ 冰箱中备用。

4.1.7 同工酶电泳

与第二章实验方法相同。

4.1.8 酶活力测定

与第二章实验方法相同。

4.2 结果与分析

4.2.1 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中 ACP 的影响

经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后, 4 种组织中 ACP 酶的电泳酶谱的变化, 如图 4.1 所示。与第二章不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾对照组 ACP 的酶谱相比, 肌肉组织和肝脏组织中有酶带的新增现象, 都增加了一条 ACP-4 酶带。其余组织酶带的表达数量没有变化。

随着注射酵母细胞壁浓度的提高, 心脏中的 ACP-2 变化呈现一定的波动性。在酵母细胞壁多糖浓度为 1.0% 和 3.0% 时, 酶带颜色变浅, 在浓度为 2.0% 时略有加深; 鳃中表达最强烈, 有 ACP-2,3,4 三条酶带, 其中 ACP-2 颜色最深, 但随着酵母细胞壁多糖浓度的提高, 没有明显的变化, ACP-3 和 ACP-4 酶带颜色在浓度为 2.0% 时均略有加深, 其余浓度无明显变化; 肝脏中有 ACP-1 和 ACP-4 两条酶带。ACP-1 颜色较深, 酶带较宽, ACP-4 颜色较浅, 酶带较窄。随着酵母细胞壁多糖浓度的提高, 两条酶带均无明显变化; 肌肉组织中共表达三条酶带 (ACP-1,3,4), 其中 ACP-3 在酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时, 颜色明显加深, 酶带变宽, 而后又变浅变窄, ACP-1 和 ACP-4 没有明显变化。总之, 经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后, 心脏和肌肉组织中酶活力变化最明显, 并且与对照组相比, 在酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时此两种组织中酶活力显著提高, 酶带颜色明显加深。

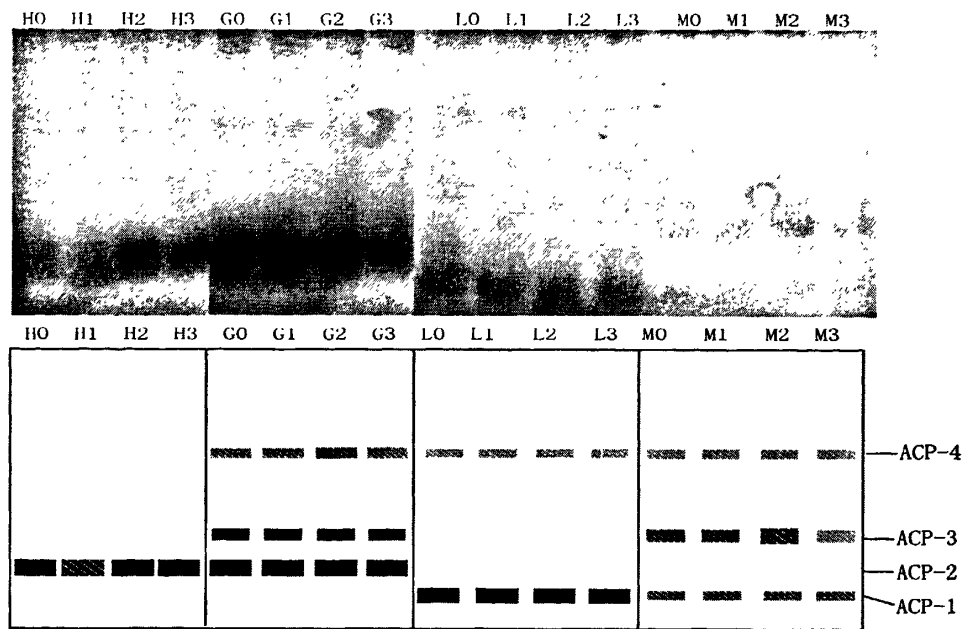


图 4.1 不同浓度酵母细胞壁多糖注射后罗氏沼虾 4 种组织中 ACP 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉；0、1、2 和 3 分别代表浓度为 0.0%、1.0%、2.0%和 3.0% 的酵母细胞壁多糖溶液

经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后，4 种组织中 ACP 活力的变化，如表 4.1 所示。随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，心脏组织中酶活力在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时与对照组具有显著性差异，且酶活达到了峰值 89.131U/L,其余注射浓度时的酶活力均与对照组无明显差异；鳃组织中的酶活力变化不明显，在注射酵母细胞壁浓度为 1.0% 时略有提高，之后酶活力开始下降，但各实验组酶活力均与对照组无明显差异；肝脏组织中的 ACP 活力先呈下降的趋势，之后在注射酵母细胞壁浓度为 2.0% 时略有提高，随后在注射酵母细胞壁浓度为 3.0% 时酶活力又再次下降；肌肉组织中的酶活力变化很明显，酶活力先呈现逐渐上升的趋势，在注射酵母细胞壁浓度为 2.0% 时达到峰值 38.995U/L，与对照组具有显著性差异，随后在注射酵母细胞壁多糖浓度为 3.0% 时，酶活力下降，但与对照组无明显差异。总之，对罗沼沼虾注射不同浓度酵母细胞壁多糖后，其体内心脏和肌肉组织中 ACP 活力变化最明显，且均在酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时酶活力明显提高。

表 4.1 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中酸性磷酸酶（ACP）活力的影响

酵母细胞壁多糖浓度 (%)	酸性磷酸酶活力/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}\pm\text{SD}(\text{n}=3)$			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0	79.383 $\pm$ 2.631	59.350 $\pm$ 1.964	196.903 $\pm$ 5.542	29.246 $\pm$ 2.107
1	75.954 $\pm$ 4.044	60.421 $\pm$ 1.401	174.192 $\pm$ 5.713	31.067 $\pm$ 2.455
2	89.131 $\pm$ 2.578*	59.242 $\pm$ 2.280	183.405 $\pm$ 7.310	38.995 $\pm$ 2.771*
3	75.740 $\pm$ 2.455	57.850 $\pm$ 1.790	170.764 $\pm$ 8.560	30.318 $\pm$ 2.496

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（ $P<0.05$ ）或极显著（ $P<0.01$ ）差异。

4.2.2 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中 POD 的影响

经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后，4 种组织中 POD 电泳酶谱的变化，如图 4.2 所示。与第二章不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾对照组的 POD 酶谱相比，无明显的酶带新增或缺失现象。

随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，心脏中的 POD-2 颜色先略有加深，在注射浓度为 2.0%时最深，而后又略有变浅；鳃组织中呈现 POD-1,2 两条酶带，其中 POD-1 随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，酶带逐渐变浅变窄，另一条 POD-2 则在浓度为 1.0%时，颜色加深，而后又略有变浅，当浓度为 3.0%时，颜色达到最浅；肝脏中表达了 POD-2 和 POD-3 两条酶带，其中 POD-2 随着注射酵母细胞壁多糖浓度的升高，呈现不规律变化，在浓度为 1.0%和 3.0%时酶带颜色变浅，浓度为 0.0%和 2.0%时，酶带颜色较深，POD-3 则在浓度为 2.0%时，酶带颜色明显加深，其余浓度的酶带宽度及颜色均无明显变化；肌肉组织中仅表达 POD-2 一条酶带，随着酵母细胞壁多糖浓度的提高，酶带颜色先略有变浅，之后在浓度为 2.0%时明显加深，但在浓度为 3.0%时又略有变浅。总之，经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后，4 种组织中的 POD 酶带颜色深浅均出现了一定的变化，当酵母细胞壁多糖浓度为 2.0%时，肝脏组织中的酶带明显变深，肌肉组织中 POD-2 酶带也略有变深；当酵母细胞壁多糖浓度为 3.0%时，鳃组织中的酶带颜色明显变浅，宽度变窄，酶活力显著下降；心脏组织中酶带的变化不明显。

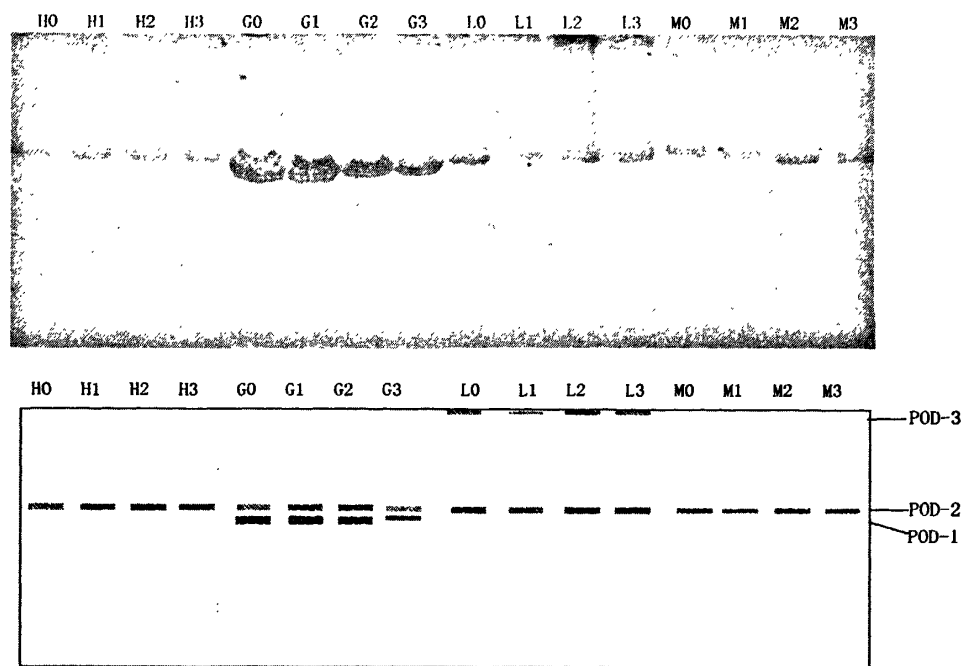


图 4.2 不同浓度酵母细胞壁多糖注射后罗氏沼虾 4 种组织 POD 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉；0、1、2 和 3 分别代表浓度为 0.0%、1.0%、2.0% 和 3.0% 的酵母细胞壁多糖溶液

经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后 4 种组织中 POD 活力的变化，如表 4.2 所示。随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，心脏组织中 POD 活力在注射酵母细胞壁多糖浓度为 1.0% 时明显下降，与对照组具有显著性差异，随后当注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 和 3.0% 时又恢复到对照组水平；鳃组织中酶活力先呈上升的趋势，这与酶谱的研究结果一致，之后在酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时酶活力开始下降，当注射酵母细胞壁多糖浓度为 3.0% 时，酶活力达到最低值 11.481 Eu/ (g.min)，与对照组具有显著性差异，电泳图谱也显示了同样的结果；肝脏组织中酶活力先略有下降，在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 明显上升，达到了酶活力的峰值 22.517 Eu/ (g.min)，与对照组差异性显著，随后当注射酵母细胞壁多糖浓度为 3.0% 时，酶活力又恢复到对照组水平；肌肉组织中的变化最弱，各实验组酶活力均与对照组无明显差异，酶活力先略有下降，之后在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时又上升，随后在注射酵母细胞壁多糖浓度为 3% 又再次下降。总之，对罗氏沼虾注射不同浓度酵母细胞壁多糖后，心脏和鳃中酶活力分别在注射酵母细胞壁多糖浓度为 1.0% 和 3.0% 时有明显降低的现象，均与对照组具有显著性差异；肝脏组织中的酶活力在注射酵母细胞壁多糖浓

度为 2.0%明显上升，且与对照组具有显著性差异；肌肉组织中的 POD 变化最弱，与对照组无明显差异。

表 4.2 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中过氧化物酶（POD）活力的影响

酵母细胞壁多糖浓度 (%)	过氧化物酶活力 (Eu/ (g.min) ±SD) (n=9)			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0	4.361±0.154	16.732±1.262	15.575±1.079	1.958±0.154
1	3.471±0.267*	17.889±1.751	12.994±1.080	1.335±0.267
2	5.607±0.534	16.910±1.609	22.517±1.204*	2.403±0.267
3	4.005±0.267	11.481±1.751*	16.465±0.672	1.602±0.267

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（P<0.05）

或极显著（P<0.01）差异。

4.2.3 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中 PPO 的影响

经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后，4 种组织中 PPO 电泳酶谱的变化，如图 4.3 所示。与不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾对照组的 PPO 酶谱相比，4 种组织均增加了一条 PPO-4 酶带，且肝脏还增加了一条 PPO-3 酶带。鳃和肝脏组织中的表达最强烈，均有三条酶带；心脏和肌肉组织均呈现两条酶带。随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，心脏中的PPO-2颜色逐渐加深，PPO-1在注射酵母细胞壁多糖浓度为2.0%时略有提高，其他浓度均无明显变化；鳃中有三条酶带（PPO-1,2,4），其中PPO-1在注射酵母细胞壁浓度为2%略有加深，其余浓度无明显变化，另两条酶带随着酵母细胞壁多糖浓度的升高无明显变化；肝脏组织中也表达了三条酶带（PPO-2,3,4），其中PPO-3颜色最深，随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，颜色逐渐变浅，PPO-2颜色先略有加深，之后在注射酵母细胞壁多糖浓度为3%时变浅。PPO-4在注射酵母细胞壁多糖浓度为2%时，颜色稍有加深，其余浓度时无显著变化；肌肉组织中有两条酶带（PPO-2,4），其中PPO-2在注射酵母细胞壁多糖浓度为2%时颜色加深，其余浓度时无显著变化。而PPO-4在注射酵母细胞壁多糖浓度为1%时颜色加深，其余浓度亦无明显变化。总之，经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后，4种组织中的PPO酶谱均出现了一定的变化，主要表现在酵母细胞壁多糖浓度为2.0%时，4种组织中相应酶带颜色均略有加深。

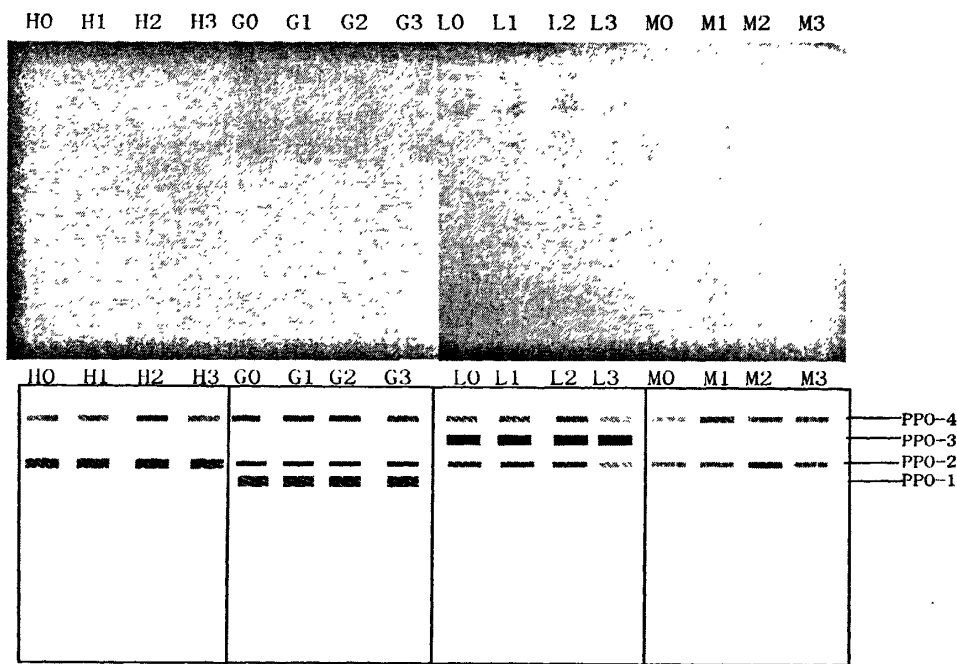


图 4.3 不同浓度酵母细胞壁多糖注射后罗氏沼虾 4 种组织中 PPO 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉组织；0、1、2 和 3 分别代表浓度为 0.0%、1.0%、2.0% 和 3.0% 的酵母细胞壁多糖溶液

经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后，4 种组织中 PPO 活力的变化，如表 4.3 所示。随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，心脏和鳃组织中的酶活力变化趋势相一致，但变化不显著，各实验组酶活力均与相应对照无明显差异。两组织中的酶活力均先下降，之后在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时略有提高，随后在注射酵母细胞壁多糖浓度为 3.0% 时酶活力又再次下降；肝脏组织中酶活力先呈逐渐上升的趋势，在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时，达到最大值，但与对照组无明显差异，当注射酵母细胞壁多糖浓度提高到 3.0% 时，酶活力略有下降；肌肉组织中的酶活力变化最明显，酶活力也先呈逐渐上升的趋势，在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时，出现了峰值 0.532U，与对照组具有显著性差异，当注射酵母细胞壁多糖浓度为 3.0% 时，酶活力又恢复到对照组水平。总之，对罗氏沼虾注射不同浓度酵母细胞壁多糖后，肌肉组织中的 PPO 活力变化最明显，且在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时酶活力达到最大，显著高于对照组水平，其余各组织也有一定的变化，但变化不明显，与对照组均无明显差异。

表 4.3 酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾 4 种组织中酚氧化酶（PPO）活力的影响

酵母细胞壁多糖浓度 (%)	酚氧化酶活力/U (n=9)			
	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0	0.330±0.026	0.407±0.015	0.473±0.029	0.368±0.023
1	0.328±0.024	0.385±0.018	0.487±0.029	0.438±0.035
2	0.383±0.033	0.440±0.026	0.558±0.068	0.532±0.053*
3	0.355±0.031	0.408±0.013	0.51±0.036	0.377±0.043

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（ $P<0.05$ ）或极显著（ $P<0.01$ ）差异。

4.2.4 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中 SOD 的影响

经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后，4 种组织中 SOD 电泳酶谱的变化，如图 4.4 所示。与不同浓度酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾对照组的 SOD 酶谱相比新增了 SOD-2,3,4 三条酶带。且肌肉中的酶活性表达有了明显的增强。心脏中含有四条酶带，除了 SOD-1,5 外，新增了 SOD-3,4 两条酶带；鳃中丢失了 SOD-1，只表达了 SOD-5 一条酶带；肝脏没有变化，依然只表达了 SOD-5 一条酶带；肌肉中变化较大，除了 SOD-5 外，新增了 SOD-1,2,4 三条酶带。

随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，心脏中的 SOD-5 在注射酵母细胞壁多糖浓度为 1.0%时颜色明显变浅且酶带变窄，而后在浓度为 2.0%和 3.0%时，酶带颜色有加深，酶带变宽，SOD-3 和 SOD-4 在注射浓度为 0.0%和 1.0%时酶带颜色略浅，在注射浓度为 2.0%和 3.0%时，酶带颜色略有加深，但并不明显，SOD-1 则无明显的变化；鳃中只有一条酶带（SOD-5），随着注射酵母细胞壁多糖浓度的升高，酶带颜色无明显变化，但在注射浓度为 1.0%是，酶带略有变宽，随后又变窄；肝脏中也只表达了 SOD-5 一条酶带，酶带的颜色先逐渐变浅，在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0%时最浅，而后又略有加深，酶带无宽度的变化；肌肉组织中酶带表达最丰富，共有四条酶带（SOD-1、2、4、5），其中 SOD-4 在注射浓度为 2.0%时，酶带颜色略有加深。SOD-5 颜色呈现逐渐加深的趋势，在注射浓度为 2.0%时达到最深，无酶带宽度的变化，SOD-1 和 SOD-2 则无明显的变化。即随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，肌肉组织中酶带的变化最明显，当注射酵母细胞壁多糖浓度时 2.0%时 SOD-5 酶带的颜色明显加深，其余组织中的酶带也略有变化，但均不明显。

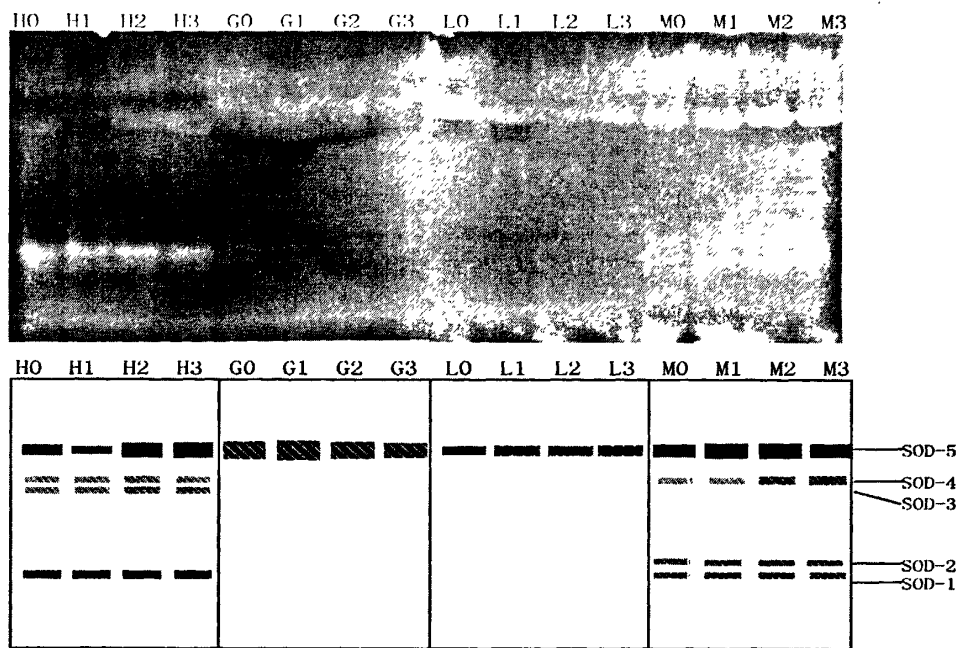


图 4.4 不同浓度酵母细胞壁多糖注射后罗氏沼虾 4 种组织中 SOD 电泳图谱及其模式图
H、G、L、M 分别代表心脏、鳃、肝脏和肌肉组织；0、1、2 和 3 分别代表浓度为 0.0%、1.0%、2.0% 和 3.0% 的酵母细胞壁多糖溶液

经不同浓度酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾后，4 种组织中 SOD 活力的变化，如表 1 所示。随着注射酵母细胞壁多糖浓度的提高，心脏组织中的 SOD 活力先略有下降，然后在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 开始上升，当注射浓度提高到 3.0% 时，出现了最大值，但与对照组差异不显著；鳃组织中的 SOD 活力先呈上升的趋势，在注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时达到最高值，但与对照组无明显差异，随后酶活力又略有下降；肝脏组织中各实验组的酶活力均低于对照组，但与对照组均无明显差异；肌肉组织中的酶活力变化最大，酶活力先逐渐上升，在注射酵母细胞壁多糖浓度为 1.0% 和 2.0% 时，酶活力显著高于对照组水平，且在注射浓度为 2.0% 时酶活力达到峰值 12.297 U/mg，当注射浓度提高到 3.0% 时酶活力又恢复到对照组水平。即沼虾经不同浓度酵母细胞壁多糖注射处理后，在注射浓度为 1.0% 和 2.0% 时肌肉组织中的 SOD 活力有显著提高，心脏和鳃组织中酶活力虽有所提高，但与对照组相比均无明显差异。

表 4.4 不同浓度酵母细胞壁多糖注射对罗氏沼虾 4 种组织中超氧化物歧化酶（SOD）活力的影响

酵母细胞壁多糖浓度	超氧化物歧化酶活力（U/mg±SD）(n=3)			
(%)	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0	105.957±6.820	69.537±3.624	69.537±4.478	9.512±0.819
1	95.891±8.449	72.844±5.236	53.521±2.156	10.449±0.421*
2	117.689±6.547	82.469±6.355	55.643±2.257	12.297±0.877*
3	119.787±8.460	75.373±3.901	58.642±3.766	10.223±0.412

酵母细胞壁多糖浓度	超氧化物歧化酶活力（U/mg±SD）(n=3)			
(%)	心脏	鳃	肝脏	肌肉
0	105.957±6.820	69.537±3.624	69.537±4.478	9.512±0.819
1	95.891±8.449	72.844±5.236	53.521±2.156	10.449±0.421*
2	117.689±6.547	82.469±6.355	55.643±2.257	12.297±0.877*
3	119.787±8.460	75.373±3.901	58.642±3.766	10.223±0.412

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数。同列数值中标有*或**者表示与对照组有显著（ $P<0.05$ ）或极显著（ $P<0.01$ ）差异。

4.3 讨论

ACP主要存在于巨噬细胞中，定位于溶酶体内，分子量为73000道尔顿^[88]，它具有催化磷酸单酯的水解反应及磷酸基团的转移的功能，能加快物质的转运及摄取^[69-70]，为ADP转化成ATP提供无机磷酸，直接参与磷酸的代谢过程。并且酸性磷酸酶还参与蛋白质、脂质、DNA和RNA等的代谢，对钙质的吸收，骨骼的形成及甲壳素的分泌等都具有十分重要的作用，又由于对虾在生长过程中都会经历换壳，所以酸性磷酸酶对于虾的生长代谢具有重要意义^[89]。我国学者刘树青等^[69-70]运用生化法测定了中国对虾磷酸酶的活性，认为酸性磷酸酶在甲壳动物血液和血细胞中担负着机体防御的重要功能。在本实验中，通过ACP同工酶酶谱可知，随着注射浓度的提高，心脏和肌肉组织中酶带颜色有明显变化，无酶带的新增现象。ACP酶活力测定也显示，在注射浓度为2.0%时，心脏和肌肉组织中的酶活力均达到峰值并与相应对照组有显著差异，分别为89.131 U/L和38.995U/L。而鳃和肝脏组织中酶活力无明显变化。即注射酵母细胞壁多糖浓度为2.0%能显著提高虾心脏和肌肉组织中ACP活力，从而提高虾体的防病抗病能力。

POD 是一类以过氧化氢为电子受体进行氧化还原反应的酶。刘树清^[67]等报道，POD 对细胞的生理代谢中产生的活性氧有清除的作用，减少自由基对细胞的损伤，从而提高机体的防病抗病能力和解毒功能。由 POD 同工酶酶谱可知，随着注射浓度的提高，鳃组织中的变化最明显，肝脏和肌肉其次，心脏中的变化最弱。鳃组织中的酶带随着注射浓度的提高，颜色逐渐变浅，宽度逐渐变窄，酶活力测定也显示，在注射浓度达最高浓度 3.0%时，鳃组织中 POD 活力最小，且

与对照组具有显著差异。这可能是因为过高的药物浓度对虾体产生了毒害作用。肝脏组织中的酶带随着注射浓度的提高均在注射浓度为 2.0% 时, 酶带颜色明显加深。酶活力测定也显示了同样的结果, 在注射浓度达 2.0% 时, 肝脏组织中的 POD 活力达到峰值且与对照组差异显著。即注射酵母细胞壁多糖浓度为 2.0% 时能显著提高虾肝脏组织中 POD 活力, 从而提高罗氏沼虾消除体内过氧化氢和酚类、胺类毒性物质的能力。

PPO 也是一种氧化还原酶类。甲壳动物只要依靠诱导先天性非特异性免疫反应来抵抗外界病原的入侵, 其中酚氧化酶原激活系统占据着重要地位, 它是一类与脊椎动物体内的补体系统相类似酶级联免疫防御系统^[90-91]。此系统中的各种因子以非活性状态存在于甲壳动物血细胞中, 外界的信号和刺激, 如 β -1, 3 葡聚糖, 肽聚糖, 脂多糖等^[80], 可以程序性地使酚氧化酶原 (proPO) 激活转变为酚氧化酶 (Phenoloxidase, PO), 有活性的酚氧化酶不仅可以催化二酚和三酚化合物, 还可以使单酚羟化, 使其转变为邻一二酚, 并使羟基酚脱氢转变成醌类物质, 这些醌类物质自发生成黑色素杨洁^[92-94]。这些黑色素及其在生成过程中产生的活性产物可以起到抑制病原体几丁质酶和胞外蛋白酶活性的作用, 从而起到抑制甚至杀死病原体的作用^[95]。王雷等对中国对虾体内的酚氧化酶活力的测定条件和方法进行了研究, 并以多种天然口服药物来免疫中国对虾, 验证了酚氧化酶活力可以作为衡量对虾免疫能力的指标^[96]。PPO 同工酶图谱相对其他酶图谱染色较浅。但随着注射浓度的提高, 各组织中的酶带也略有变化。4 种组织中的 PPO 酶带均在注射浓度为 2.0% 时略有加深, 其余注射浓度无明显变化。酶活力测定结果显示, 各组织中 PPO 酶活力均在注射浓度达 2.0% 时出现峰值, 但只有肌肉组织中的酶活力与对照组具有显著性差异。即对罗氏沼虾注射 2.0% 的酵母细胞壁多糖能显著提高虾肌肉组织中的 PPO 含量, 从而提高机体免疫防御能力。

SOD 是一类重要的抗氧化酶, 它能催化超氧化物自由基 O_2^- 和氢离子 H^+ 反应形成过氧化氢和分子氧, 消除生物机体在新陈代谢及生长过程中产生的超氧化物等有害物质。近年来有研究表明, SOD 活性与生物的免疫能力密切相关^[97], 认为 SOD 的活性变化可以作为衡量对虾免疫水平的指标, 甚至可以作为定量指标。由 SOD 同工酶图谱可知, 随着酵母细胞壁多糖浓度的提高, 肌肉组织中的酶带颜色变化最明显, 在注射浓度为 2.0% 时, 酶带颜色达到最深, 酶活力测定结果也显示,

当注射浓度为1.0%和2.0%时,酶活力显著提高,且当注射浓度为2.0%时,酶活力出现峰值12.297 U/mg,相当于与对照组的1.29倍。其余组织中SOD活力的变化均不显著。因此,本实验认为,当注射浓度为2.0%时,能显著提高罗氏沼虾肌肉组织中SOD活力,从而提高虾体的抗氧化能力。

综上所述,利用不同浓度的酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂对罗氏沼虾进行腹腔注射处理,结果表明,注射这种给药方法也能诱导激活罗氏沼虾虾体的免疫反应,提高其免疫相关酶的活力,在注射浓度为2.0%时,4种组织中4种免疫酶活性增强最显著。因此可认为,利用酵母细胞壁多糖作为免疫促进剂对罗氏沼虾进行腹腔注射,2.0%浓度处理时免疫增强最显著。

第五章 注射酵母细胞壁多糖不同时间后对罗氏沼虾免疫相关同工酶的影响

虾属于无脊椎动物,缺乏类似于脊椎动物的特异性免疫系统,只能依靠诱导先天性非特异性免疫反应来抵抗外界病原的入侵^[99]。ACP、POD、PPO和SOD等酶类是甲壳动物体液免疫防御系统中的重要免疫因子。威兰^[100]等分析比较了南美白对虾和日本沼虾体内ACP、POD、ALP和SOD等免疫相关同工酶,结果表明,两种虾类各种免疫相关同工酶的活力不尽相同,其体内的免疫功能也不相同。最近几年,在对甲壳动物的研究中,已经把ACP和POD看作是检测甲壳动物免疫功能的指标酶^[101]。

由湖北省安琪酵母公司生产的酵母细胞壁多糖已被证实是一种可以诱导刺激甲壳类水产动物产生非特异性免疫反应的物质^[102]。Miyazano和Matsuo^[43]用肽聚糖处理虹鳟鱼28d后,虹鳟鱼对鳃弧菌(*V. anguillarum*)的抵抗能力明显提高,但当处理时间达到56d时,虹鳟鱼的免疫力则未增强。因此,在使用酵母细胞壁多糖等免疫促进剂时要注意其有效作用期限,确定最佳处理时间。然而有关腹部注射酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾的有效作用时间,至今未见报道。因此本实验利用2.0%的酵母细胞壁多糖作为免疫激活剂对罗氏沼虾进行腹腔注射处理,分别在24h, 48h, 72h, 96h和120h取肝脏、心脏和肌肉组织,测定其ACP和POD的活性来探讨这两种酶活性与罗氏沼虾机体免疫水平的相关性,并为酵母细胞壁多糖在沼虾的生产实践中提供一定的理论依据。

5.1 材料与方法

5.1.1 实验材料

2009年7月份从上海市冠生园路徐汇区漕河泾菜市场购买个体大小均一并健康(长度约为10-13cm、重量约为18-21克)的罗氏沼虾。

5.1.2 酵母细胞壁多糖

采用与第二章相同的产品。

5.1.3 实验试剂

愈创木酚、双氧水、氢氧化钠、乙醇、乙酸、乙酸钠,磷酸氢二钠,磷酸二

氢钠等试剂均购于国药集团化学试剂有限公司;对硝基苯磷酸二钠盐购于上海楷洋生物技术有限公司。

5.1.4 实验仪器

电子天平FA1004、HHS-2S型电热恒温水浴锅、METTLER TOLEDO 320-S pH计、玻璃匀浆器、台式冷冻离心机、TU-1810 紫外可见分光光度计、DHP-9082型电热恒温培养箱。

5.1.5 对罗氏沼虾的注射处理

买回的实验用虾先放入盛有60L水的聚乙烯水簇箱中饲养,实验室暂养两天后,选取个体大小相近的罗氏沼虾,采用腹部体腔注射的方法,对试验组虾注射酵母细胞壁多糖溶液0.1ml/尾^[85],对照组沼虾也要进行注射处理,每尾注射等量的无菌生理盐水,50尾沼虾为一组。每天8:00和17:00各投饵一次,换水1/3,用虹吸法去除排泄物和多余饵料。水温维持在23℃左右,自然光照,用充气泵日夜连续充气。

5.1.6 样品制备

注射处理后,每隔24h从两个处理组中随机抓取6-7只活虾,迅速放入冰盘中解剖,取虾体的心脏,肝胰脏和肌肉3种组织,用滤纸吸干组织液以后称其重量,以1:10(W/V)的比例加入预冷的生理盐水,置于冰块中用匀浆器匀浆。匀浆后于4℃条件下以12000r/min离心30 min,之后取上清液作为粗酶液。

5.1.7 酶活力测定

ACP活力测定方法:参照文献^[61]利用磷酸苯二钠为底物来测定实验虾心脏、鳃、肝胰腺和肌肉4种组织提取液中ACP的酶活力。酶活力单位:在37℃水浴中每100 ml的样品与底物作用60 min后,并产生1.0mg酚记作为1个ACP酶活力单位。

POD活力测试方法:参照文献^[62-63],首先往50ml的0.1mol/L PBS(pH7.0)中加入19ul 30%的双氧水和28ul的愈创木酚制成反应液。之后,将反应液与酶液以1:3(V/V)的比例混匀,于470nm波长下测定光吸收值。每隔1min测定一次,并记录数据,测定15min。酶活力单位:每分钟内光吸收值变化0.01记作为1个POD酶活力单位。

5.2 结果与分析

5.2.1 注射酵母细胞壁多糖不同时间后对罗氏沼虾体内 ACP 活性的影响

对实验用虾注射处理后，分别在24h、48h、72h、96h和120h测定沼虾心脏，肝脏和肌肉组织中的ACP活性，测定结果如表5.1所示。由表5.1可知，实验组虾的心脏组织和肌肉组织中的ACP活力均在72h、96h和120h显著高于对照组沼虾的酶活力（t测验， $P<0.05$ ），肝脏组织中ACP活力是在96h和120h与对照组具有了显著性差异（t测验， $P<0.05$ ）。对于实验组虾的不同组织而言，肝脏组织中的ACP活力提高幅度最大，在96h达到了酶活力高峰284U/L,相当于对照组的1.5倍。而心脏组织和肌肉组织中的ACP活力峰值分别为其相应对照组的1.35倍和1.26倍。由以上结果可知，对罗氏沼虾注射酵母细胞壁多糖可以提高沼虾体内心脏，肝脏和肌肉组织中的ACP活力，但对肝脏组织的免疫激活时间晚于另外两个组织。

表 5.1 注射酵母细胞壁多糖不同时间后罗氏沼虾体内酸性磷酸酶（ACP）活性的变化

Table 5.1 Effects of yeast cell wall polysaccharide on acid phosphatase (ACP) activities of *M. rosenbergi*

样品 Samples	组别 Groups	采样时间与 ACP 活性/ $U \cdot L^{-1} \pm SD(n=6)$				
		24h	48h	72h	96h	120h
心脏 Heart	实验组	74.2±0.8	75.9±0.7	93.0±0.4*	83.6±0.5*	76.1±0.9*
	对照组	76.7±0.6	72.6±0.6	68.7±0.5	65.2±0.8	68.2±0.3
肝胰脏 Hepatopancreas	实验组	171.0±0.6	190.1±0.6	204.5±0.7	284.0±0.3*	267.3±0.8*
	对照组	178.7±0.8	186.9±0.7	182.5±0.8	184.0±0.9	185.9±0.6
肌肉 Muscle	实验组	23.5±0.8	29.7±0.9	34.5±0.6*	32.2±0.5*	31.9±0.5*
	对照组	21.6±0.9	25.3±0.7	27.3±0.6	25.7±0.8	23.0±0.8

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*者表示与对照组有显著差异（ $P<0.05$ ）

5.2.2 注射酵母细胞壁多糖不同时间后对罗氏沼虾体内 POD 活性的影响

对实验用虾注射处理后，分别在 24h、48h、72h、96h 和 120h 测定虾心脏，肝脏和肌肉组织中的 POD 活性，测定结果如表 5.2 所示。由表 5.2 可知，实验组心脏和肝脏组织中 POD 活力有明显提高。心脏组织中 POD 活力在 72h 和 96h 显著高于对照组（t 测验， $P<0.05$ ），并且在 72h 达到了酶活力高峰 5.38U/L，相当于到对照组的 1.2 倍。肝脏组织中的 POD 活力在 48h 和 72h 与对照组具有显著性差异（t 测验， $P<0.05$ ），并在 48h 达到了酶活力高峰 23.16U/L，相当于对照组 1.4 倍。而肌肉组织的变化较弱，但与对照组相比无明显差异。由以上结果可知，对罗氏沼虾注射酵母细胞壁多糖可以提高沼虾体内心脏，肝脏和肌肉组织中的 POD 活性，但持续时间较短，两组织的酶活力分别在 120h 和 96h 均回落到对

照组水平，并且肝脏组织的免疫激活时间早于心脏组织，在 48h 酶活力就有显著提高。

表 5.2 注射酵母细胞壁多糖不同时间后罗氏沼虾体内过氧化物酶（POD）活性的变化
Table 5.2 Effects of yeast cell wall polysaccharide on peroxide (POD) activities of *M. rosenbergi*

样品 Samples	组别 Groups	采样时间与 POD 活力 (Eu/ (g.min) ±SD) (n=6)				
		24h	48h	72h	96h	120h
心脏	实验组	4.78±0.07	4.74±0.04	5.38±0.04*	4.63±0.02*	4.33±0.04
Heart	对照组	4.84±0.01	4.67±0.07	4.62±0.08	4.38±0.03	4.26±0.01
肝胰脏	实验组	19.20±0.03	23.16±0.09*	20.05±0.09*	17.18±0.04	15.92±0.05
Liver	对照组	18.82±0.02	16.53±0.03	16.93±0.03	17.36±0.08	16.17±0.09
肌肉	实验组	1.91±0.08	1.90±0.04	1.81±0.01	1.86±0.02	1.81±0.07
Meat	对照组	1.93±0.05	1.87±0.04	1.81±0.02	1.78±0.03	1.74±0.05

注：SD 表示标准偏差；n 表示实验重复的次数.同列数值中标有*者表示与对照组有显著差异 (P<0.05)

5.3 讨论

5.3.1 两种免疫相关酶的变化

酵母细胞壁多糖是一种真菌多糖，有研究表明它能加快甲壳动物免疫器官的发育，增强淋巴细胞的数量，既可以增强动物机体非特异性免疫，又能激发体液免疫反应。Riggi 于 1961 年就已确定酵母聚糖中的活性成分主要为 β-葡聚糖。水产动物体内巨噬细胞的表面具有一个葡聚糖的特殊受体，因此当 β-葡聚糖与巨噬细胞结合后就可以促进巨噬细胞的吞噬与杀菌活性^[103]，或通过补体途径激活机体的体液免疫反映^[104]。但也有研究发现，不同的对象，不同的给药方法会带来不同的结果。Selvaraj^[42]等利用 β-葡聚糖对对鲤（*Cyprinus carpio*）进行注射，浸浴和口服处理 1-5d 后，测定 β-葡聚糖对对鲤超氧阴离子生成的影响，发现只有注射方式作用明显。Engstad^[12]等学者也研究证实，用酵母 β-葡聚糖注射大西洋鲑，可以提高其血清溶菌酶的活性。许第新^[93]利用酵母细胞壁多糖注射克氏原螯虾后，发现虾体肝胰脏组织中的 ALP 和 ACP 活性有明显增加。本实验研究结果也表明，对罗氏沼虾腹腔注射酵母细胞壁多糖可以提高供试虾体内 ACP 和 POD 的活性。因此在生产实践中可以考虑对个体较大的虾在病毒感染前注射酵母细胞壁，增强其免疫抵抗能力。并且本实验还发现实验组沼虾心脏，肝脏和肌肉组织中 ACP 的酶活力在 72 或 96h 开始有明显提高后一直维持较高水平，一直到 120h 后酶活力仍与对照组具有显著差异。沼虾心脏和肝脏中的 POD 活力分别于 72h

和 48h 后显著提高达到峰值, 且均维持了 24h, 分别于 96h 和 72h 仍然显著高于对照组。这说明对沼虾注射酵母细胞壁多糖至少可以在 48-120h 内使沼虾体内免疫因子含量一直维持较高水平, 可以更有效的抵抗病毒。但至于 120h 后是否还会出现酶活力明显增强, 还需进一步实验证明。

酸性磷酸酶 (ACP) 主要存在于细胞溶酶体内, 能够加速物质的摄取和转运, 对动物机体的骨化起着重要作用, 并且还是动物体内重要的解毒体系。因此 ACP 对于虾的生长和生存具有十分重要的意义^[105-107]。过氧化物酶 (POD) 是一种含铁的金属酶, 参与多种生理代谢反映, 是生物体重要的酶类之一^[108]。其主要功能是清除生物体内有机物质降解代谢过程中所产生的酚和胺等的过氧化物, 避免活性氧自由基启动膜脂脱酯或膜脂过氧化作用, 从而保护了细胞生物膜^[21]。在本实验中罗氏沼虾的心脏, 肝脏和肌肉组织中均具有 ACP 和 POD 活性, 其中肝脏中的酶活力最高, 心脏次之, 肌肉中的 ACP 和 POD 酶活力最弱。这主要是由于不同组织中 ACP 和 POD 的含量不尽相同的缘故^[104]。并且本实验还发现不同器官和不同组织中 ACP 和 POD 活性变化也存在差异。这可能是由于酵母细胞壁对不同组织的刺激效果有所不同的缘故。相对来说, 酵母细胞壁多糖对肝脏组织的刺激作用最大, ACP 和 POD 活性分别提高了 50% 和 40%。但肝脏组织中 ACP 的免疫激活时间晚于心脏和肌肉两个组织, POD 的免疫激活时间却早于心脏组织。心脏和肌肉组织中的 ACP 活力在 72h 显著上升后, 持续了较长一段时间, 而心脏和肝脏组织中的 POD 活力维持的时间相对较短。这可能是由于两种酶对刺激的敏感程度不同的缘故。

5.3.2 两种给药方法免疫增强效果的比较

本研究发现, 浸浴和注射两种给药方法均能诱导激活虾体的免疫反应, 提高沼虾免疫相关酶的活力。有研究也发现以注射和浸泡方式, 用壳聚糖和几丁质对虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 进行处理, 其免疫力也有增强效果^[98]。但本研究还发现注射试验对照组中部分免疫相关酶的酶谱及酶活力水平与浸浴实验的对照组有明显差异。从酶谱观察到, 采用注射的给药方法所得到的各种酶的图谱较浸浴的酶谱复杂, 酶带数量更多且颜色更深, 例如: 注射实验对照组在肌肉组织中的 ACP 都增加了一条 ACP-4 酶带; 在心脏、鳃、肝脏和肌肉 4 种组织中的 PPO 均增加了一条 PPO-4 酶带, 肝脏组织中还增加了一条 PPO-3 酶带; 在肌

肉组织中的 SOD 新增了 SOD-3、4、5 三条酶带, 心脏组织中新增了 SOD-4、5 两条酶带。酶活力表也显示, 注射实验对照组较浸浴实验对照组所得到的部分酶活力较高。例如: 注射实验对照组鳃和肝脏组织中的 ACP、PPO 和 SOD 活力、心脏组织中的 ACP 和 PPO 活力、肌肉组织中的 POD 和 PPO 活力均显著高于浸浴实验对照组水平。这可能是由于注射这种相对不太温和的给药方式对沼虾的机体产生了较大的刺激作用所造成的虾体内免疫系统应激反应的结果。

随着酵母细胞壁多糖浓度的变化, 两种给药方法对不同组织的激活敏感程度也不尽相同。采用浸浴的给药方法, 对虾体鳃组织的刺激作用最明显, 其内 ACP、POD、PPO 和 SOD 4 种免疫酶活力均有明显上升, 心脏中的 SOD 和 ACP 以及肝脏中的 ACP 活力也有明显增强, 但肌肉组织中的免疫相关酶活力无明显激活作用。采用注射的给药方法, 对虾体肌肉组织的刺激作用最明显, 其内 ACP、SOD 和 PPO 活力均有显著提高, 心脏中的 ACP 以及肝脏中的 POD 活力也有明显上升, 但鳃组织中的 4 种免疫相关酶活力反而没有显著提高。这可能是由于给药方法的不同而导致不同组织对酵母细胞壁多糖敏感程度的不同, 采用浸浴的给药方法可以使鳃组织直接与水体中的酵母细胞壁多糖快速接触, 从而对该组织的免疫激活作用最明显。

实验还发现采用注射的给药方法相对浸浴的给药方法能在更短的时间内提高机体的免疫能力。例如, 采用 2% 酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾 72h 后, 心脏组织中的 ACP 酶活力就达到了 93U/L, 96h 后肝脏组织中的 ACP 活力也达到了峰值 284 U/L, 而采用最佳浸浴浓度 125.00 mg/L 的酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾 144h 后心脏和肝脏组织中的 ACP 酶活力才达到峰值, 分别为 72.955 U/L 和 215.930 U/L。虽然采用注射的方法可以快速、有效的提高沼虾体内免疫因子的水平, 但这种方法费时费力, 操作难度较大, 尤其不适宜个体稍小的虾类, 因此有必要进一步研究口服这种给药方法对罗氏沼虾虾体免疫功能的影响。在实际操作中, 应对各种影响因素进行综合分析之后再确定最适宜的给药方法。

全文结论

本文采用了浸浴和注射两种给药方法,来探究酵母细胞壁多糖对罗氏沼虾免疫功能的影响。结果如下:

1 酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾对其体内免疫相关同工酶的影响

采用不同浓度的酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾,实验结果发现当浸浴浓度为125.00mg/L时,虾体内酶活力变化最显著,鳃组织中的ACP、PPO和POD活力,心脏组织中的ACP和SOD活力以及肝脏组织中的ACP活力均达到酶活力峰值。但肌肉组织中的4种免疫相关酶活力均无明显变化。因此,本实验认为使用浸浴的给药方法能诱导激活虾体内免疫系统,提高免疫相关同工酶活力,进而增强虾体的抗病能力,且当浸浴浓度为125.00 mg/L时效果最佳。

利用125.00 mg/L的酵母细胞壁多糖浸浴罗氏沼虾,结果发现当浸浴时间达96h后鳃和肝脏中的PPO活力达到峰值,维持到144h仍显著高于对照组。并且在浸浴时间为144h后沼虾鳃和肝脏组织中ACP和POD活力以及心脏组织中的SOD活力也均达到峰值,显著高于相应对照组水平。因此,本实验认为酵母细胞壁多糖浸浴的有效作用时间为96-144h。

2 酵母细胞壁多糖注射罗氏沼虾对其体内免疫相关同工酶的影响

采用不同浓度酵母细胞壁多糖腹腔注射罗氏沼虾,结果发现当注射浓度为2.0%时,虾体内的免疫相关同工酶活力有明显的提高,肌肉组织中ACP、PPO和SOD活力,肝脏组织中的POD活力以及心脏组织中的ACP活力均达到了酶活力峰值且均显著高于相应对照组酶活力水平。因此,本实验认为注射的给药方法能明显提高罗氏沼虾免疫能力,且当注射浓度为2.0%时效果最佳。

采用2.0%的酵母细胞壁多糖腹腔注射罗氏沼虾,结果发现,酵母细胞壁多糖注射沼虾对其有免疫增强作用,但是不同组织、不同酶激活的时间及维持时间不同。ACP在肝脏组织中的被激活时间晚于心脏和肌肉组织,而POD在肝脏组织中的被激活时间却早于心脏组织。并且心脏和肌肉组织中的ACP活力在72h显著上升后,持续了较长一段时间,而心脏和肝脏组织中的高水平POD活力维持的时间相对较短。并且实验还表明对沼虾注射2.0%酵母细胞壁多糖48h后就可以起到明显的免疫增强作用,且这种增强作用可维持至120h。

3 两种给药方法作用效果的比较

本实验研究发现,浸浴和注射两种给药方法均能诱导激活罗氏沼虾的免疫反应,提高其免疫因子的活力。但注射试验对照组中部分免疫相关酶的酶谱及酶活力水平与浸浴实验的对照组有明显差异,采用注射的给药方法所得到的各种酶的图谱复杂,酶带的数量更多且颜色更深,从酶活力表也分析出,采用注射的给药方法所得到的部分酶活力较高。随着酵母细胞壁多糖浓度的变化,两种给药方法对不同组织中的刺激程度也不尽相同,采用浸浴的给药方法,对鳃组织中的免疫刺激作用最强,肌肉最弱,而采用注射的给药方法恰恰相反,对肌肉组织的免疫刺激作用最强,鳃最弱。另外,采用注射的给药方法相对浸浴的给药方法能在更短的时间内提高机体的免疫能力,但是浸浴的给药方法维持的免疫增强时间较长。

4 小结

总之,两种给药方法均能刺激机体产生免疫反应,但注射的给药方法效果相对更佳,且在短时间内酶活力即达到峰值。然而,在水产养殖生产实践中,此种给药方法费时费力操作难度较大,并且不适宜较小的虾类。而浸浴的给药方法,用药量较大,但被虾体吸收起作用的药量却很少,因此进一步研究口服这种给药方法对罗氏沼虾虾体免疫功能的影响是很有必要的。在生产实践中,应综合分析各种影响因素之后再确定最适宜的给药方法。

致 谢

行文至此，我的这篇论文已接近尾声；岁月如梭，我三年的研究生时光也即将敲响结束的钟声。离别在即，站在人生的又一个转折点上，心中难免思绪万千，一种感恩之情油然而生。

生我者父母。感谢生我养我，含辛茹苦的父母。是你们，为我的学习创造了条件；是你们，一如既往的站在我的身后默默的支持着我。没有你们就不会有我的今天。谢谢你们，我的父亲母亲！

育我成才者老师。感谢我的指导老师许燕副教授，这篇论文是在许燕老师的悉心指导与鼓励下完成的。许燕老师为我提供了良好的实验条件，在申请和开展项目、参加学术会议、撰写论文等方面提供了很多专业性的指导。许燕老师渊博的学识、严谨的治学态度、精益求精的工作作风和诲人不倦的高尚师德，都将深深地感染和激励着我。在三年的实验室时光里，许燕老师不仅在学业上给我以悉心指导，同时还在思想、生活上给我以无微不至的关怀，在此谨向许燕老师致以诚挚的感谢！

感谢我的学妹余静，她在实验中给予了我许多的帮助。

感谢动物学 2008 级的同学们。三年来，是同学让我的研究生生活变得更加丰富多彩，我们一起亲历了研究生的别样生活，愿同窗友谊之树长青。

感谢学姐杨洁和黄颖，她们曾让我感受到前所未有的自信与快乐，曾向我展示了一个特别的世界，让我意识到自己的许多不足，真诚地道一声“谢谢”！

参考文献

- [1] 朱勇夫等. 罗氏沼虾生物学特性及人工养殖技术(一)[J]. 渔业致富指南. 2006, (13): 62-63.
- [2] 袁春蓉等. 罗氏沼虾的营养生理研究进展[J]. 饲料广角. 2003, (8): 26-30.
- [3] 郑凯迪等. 罗氏沼虾棚式高产养殖技术[J]. 云南农业科技. 2003, (6): 33-34.
- [4] 鄢华, 汪开毓. 营养素对水产动物免疫功能的影响[J]. 水利渔业. 2006, 26(5): 88-91.
- [5] Yano T. The nonspecific immune system: humoral defense [A]. Iwamat G. Nakarishi T The Fish immune System [M], London Academic press, 1996, 105-157.
- [6] Jorgensen J B, Rorbertsen B Yeast β -glucan stimulate respiratory burst activity of Atalantic salmon (*Salmo salar* L) macrophages[J]. Dev Comp Immunolgy, 1995, 19: 43-57.
- [7] 周艳萍. β -葡聚糖对异育银鲫非特异性免疫和生长性能的影响[M]. 武汉: 武汉工业学院编辑社. 2008.
- [8] 王忠, 吕于明, 牛桂琴. 日粮中添加酵母 β -1, 3 / 1, 6-葡聚糖对哺乳仔猪生长性能和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志. 2006, 42(21): 19-22.
- [9] 刘影等. β -1, 3 / 1, 6-葡聚糖对肉仔鸡生产性能和免疫功能的影响[J]. 中国农业大学学报. 2003, (1).
- [10] Sung H H, Koom G H, Song Y L. Vibrosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Fish Pathology, 1994, 29: 11-17.
- [11] Rorbersen B, Rostad G, Engstad R, *et al.* Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon. *Salmo salar* L, by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls [J]. J Fish Dis, 1990, 13: 391-400.
- [12] Engstad R E, Roberesen B, Friuold E. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atalantic salmon blood [J]. Fish Shellfish Immunol. 1992, 2: 287-297.
- [13] Jorgensen J B, Lunde H, Roberesen B. Pertoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L[J]. J Fish Dis. 1993, 16: 313-325.
- [14] Lopez N, Cuzon G, Gaxiola G *et al.* Physiological nutritional, and immunological role of dietary β -1, 3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* Juveniles. Aquaculture. 2003, 224: 223-243.
- [15] Wigglesworth JM, Griffith D RW. Carbohydrate digestion in *Penaeus monodon*. Mar. Biol, 1994, 120: 571-578.
- [16] 周艳萍等. β -葡聚糖在水产动物健康养殖中的应用[J]. 河北渔业. 2009, (2).
- [17] 赵季, 任俊琦, 卢彩霞等. 酵母细胞壁多糖的研究进展[J]. 中国食品添加剂. 2009, 1: 82-85.
- [18] 王文彬. 建立水产品质量安全长效机制势在必行[J]. 海洋渔业. 2007, 11: 8-9.
- [19] 汪小锋, 樊廷俊, 丛日山, 等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量

- 和活性的影响[J]. 水产学报. 2005, 29(1): 66-73.
- [20] 许第新, 姚娟, 陈昌福. 注射免疫多糖(酵母细胞壁)对克氏原螯虾几种免疫相关酶的影响[J]. 安琪酵母专栏, 2004, 34(5): 56-58.
- [21] 陈昌福, 姚娟, 陈萱, 等. 免疫多糖对南美白对虾免疫相关酶的激活作用[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(5): 551-554.
- [22] Chang C F, Su M S, Chen H Y, et al. Dietary β -1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus[J]. Fish & Shellfish Immunol, 2003, 15(4): 297-310.
- [23] Steinar M, Paulsen R E. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide[J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11(1): 23-27.
- [24] 陈昌福, 姚娟, 吴凡华. 免疫多糖(酵母细胞壁)对受免疫抑制的鲫鱼免疫应答的调节作用[J]. 淡水渔业, 2004, (4): 55-57.
- [25] Engstad R E, Robertsen B, Frivold E. Yeast glucan induces in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish and Shellfish Immunology, 1992, 2(4): 287-297.
- [26] 陈超然, 陈萱, 陈昌福, 等. 酵母 β -葡聚糖对受免疫抑制银鲫免疫应答的增强作用[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(4): 380-384.
- [27] Yoshida T, Kruger R, Inglis V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus*(Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. [J]. J Fish Dis. 1995, 18: 195-198.
- [28] 李莉等. 多糖类免疫增强剂在水产养殖中的应用研究概况[J]. 河南水产. 2008, (2): 6-8.
- [29] 胡火庚等. 饲料中添加酵母复合物对中华绒螯蟹的免疫调节作用[J]. 长江大学学报: 农学卷. 2007, 4(2): 36-40.
- [30] 殷海成. 饲料中添加酵母免疫多糖对黄河鲤鱼生长和非特异性免疫力的影响[J]. 中国饲料. 2009, (14): 33-35.
- [31] 迟淑艳等. β -葡聚糖对奥尼罗非鱼生长性能及抗嗜水气单胞菌感染的影响[J]. 中国水产科学. 2006, (5).
- [32] 张起信, 刘光穆, 牛明宽, 等. 免疫多糖在鲍育苗中应用的初步探讨[J]. 齐鲁渔业. 2002, 19(4): 3-4.
- [33] Song Y L, Liu J J, Chan L C, et al. Fish Vaccinology: Dev Biol Stand, 1997, 90: 413.
- [34] 李响等. DNA疫苗与多糖类免疫促进剂在对虾疾病控制上的应用研究进展[J]. 动物医学进展. 2008, 29(11): 52-54.
- [35] 高有领. 多糖类免疫促进剂在虾类疾病控制上的应用研究进展[J]. 浙江万里学院学报. 2007, 20(5): 67-71.
- [36] 孙翠慈, 王安利, 胡俊荣. β -(1,3)-葡聚糖对水产动物免疫系统的调节功效[J]. 海洋科学. 2004, 28(3): 60.
- [37] 高有领. 多糖类免疫促进剂在虾类疾病控制上的应用研究进展[J]. 浙江万里学院学报. 2007, (5): 67-71.

- [38] 陈昌福等. 浅谈微生态制剂在水产养殖中应用的问题[J]. 渔业致富指南. 2008, (3): 64-65.
- [39] 许国焕, 梁友光, 吴月嫦, 等. 酵母葡聚糖对南美白对虾免疫功能的影响[J]. 饲料工业, 2003, 24(10): 53-54.
- [40] Cheng FC, Houg Y C, Mao S S, *et al.* Immunomodulation by dietary β 1, 3 glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(6): 505-514.
- [41] 李富东等. 长时间连续投喂 β 葡聚糖对鲤生长性能及非特异性免疫功能的影响[J]. 动物营养学报. 2009, 4.
- [42] Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19: 293-306.
- [43] Matsuo K and Miyazano I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1993, (59): 1377-1379.
- [44] 陈峰等. 调好免疫力[J]. 生活与健康. 2008, (7).
- [45] Scholz U, Garcia G, Ricque D, *et al.* Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products[J]. Aquaculture. 1999, 176: 271-283.
- [46] Song Y L, Sung H H. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 1990, 10: 98.
- [47] Itami T, Takahashi Y. *J Aquat Anim Health*, 1991, 3: 151
- [48] Alabi A O, Jones D A, Latchford J W. Aquaculture, 1999, 178: 1
- [49] 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响. 中国水产科学, 2004.11 (6): 537-541.
- [50] 何南海. 对虾免疫功能指标的建立及其应用. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(3): 385-388.
- [51] 庞秋香, 张士瑾, 王长法, 等. 雌雄文昌鱼同工酶的表型差异[J]. 动物学报. 2004, 50(1): 62-67.
- [52] 贾秀英, 董爱华. 铅对蟾蜍肝、肾过氧化物和酯酶同工酶的影响[J]. 生态学杂志. 2005, 24(2): 159-162.
- [53] 宋善俊. 临床医师手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 185-200.
- [54] 辜云杰, 邓小敏, 张建康等. IBA 及 NAA 对山杜英组培苗生根过程中 POD、PPO 活性的影响[J]. 热带植物科学. 2004, 33(2): 8-9.
- [55] Halevy A H, Mayak S. Senescence and Postharvest Physiology of Cut Flower[J]. Partz.Hortic Rev, 1981, (3): 59-143.
- [56] 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.
- [57] 刘岩, 江晓路. 聚甘露糖醛酸对中国对虾免疫相关酶活性和溶菌溶血活性的影响[J]. 水产学报. 2000, 24(6): 549-553.
- [58] Barnes H, Blackstock J. Seasonal changes in the non-specific phosphatase activities and their relation to other metabolic activities in *Balanus balanoides* (L.) and *B. balanus* (L.) [A]. Ninth European Marine Biology Symposium[C]. Aberdeen, UK: Aberdeen University Press, 1975.
- [59] Frank J R, Sulkin S D, Morgan R P. Biochemical changes during larval development of the xanthid crab

- Rhithropanopeus harrisi*. Protein, total lipid, alkaline phosphatase, and glutamic oxaloacetic transaminase[J]. Mar Biol, 1975, 32(2): 105-111.
- [60] Soderhall K, Hall L. Lipopolysaccharide induced activation of the prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte[J]. *Biochem Biophys Acta*. 1984, 797: 99-104.
- [61] 王雷. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖泊. 1994, 25(5): 481-468.
- [62] S J derhYll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity [J]. Current Opinion in Immunology, 1998, 10(1): 23-28.
- [63] Sung HH, Chang HJ, Her CH, et al. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*[J]. J Invertebr Pathol. 1998, 71(1): 26-33.
- [64] Supphantharika M, Khunrae P, Thanardkit P, et al. Preparation of spent brewer's yeast[beta]-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Bioresource Technology, 2003, 88(1): 55-60.
- [65] Campa-Cordova A I, Hernandez-Saavedra N Y, et al. *Fish Shellfish Immunol*. 2002, 12: 353.
- [66] 赵季, 任俊琦, 卢彩霞, 等. 酵母细胞壁多糖的研究进展[J]. 中国食品添加剂. 2008, 1-5.
- [67] 朱春森, 徐春厚. 酵母细胞壁多糖的研究进展[J]. 江西饲料, 2007, 4: 15-17.
- [68] Bagni M, Romano N, Finioia M G, et al. Short-and long-term effects of a dietary yeast [beta]-glucan(Macrogard)and alginic acid(Ergosan)preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Fish& Shellfish Immunology. 2005, 18(4): 311-325.
- [69] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖泊. 1999, 30(3): 278-283.
- [70] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对日本对虾血清酶活性的影响[J]. 中国水产科学. 1999, 6(3): 111-113.
- [71] Matsuyama H, Mangindaan R E P and Yano T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail(*Seriola quinqueradiata*)[J]. Aquaculture. 1992, 101(3-4): 197-203.
- [72] Albores F V, Plascencia YG. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response [J]. Aquaculture, 2000, 191: 13-21.
- [73] 刘恒, 李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖泊. 1998, 29(2): 113-118.
- [74] 丁美丽, 林林, 李光友. 有机污染对中国对虾体内外环境影响研究[J]. 海洋与湖泊. 1997. 28(1): 7-11.
- [75] 杨天骄, 孙英峰, 王英珍等. 啤酒酵母葡聚糖免疫调节作用及应用研究进展[J]. 动物医学进展. 2008, 29(11): 92-95.
- [76] Boyd C E. World Aquacul, 1996, 27(3): 41.
- [77] Gomes L A. World Aquacul, 1992, 23(3): 18.
- [78] Williams R R, Bll T A, Lightner D V. *J Aquat Anim Health*, 1992, 4: 262.
- [79] Primavera J H, Lavilla-Pitogo C R, Ladjia J M, et al. *Mar Pollut Bull*, 1993, 26(1): 35.

- [80] Itami T, Takahashi Y, Nakamura Y. *J Aquat Anita Health*, 1989, 1: 238.
- [81] Song Y L, Sung H H. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 1990, 10: 98.
- [82] J Adams A. *Fish shellfish Immunol*, 1991, 1: 59.
- [83] Sung H H, Song Y L, Kou G H. *Fish Shellfish Immunol*, 1991, 1:311.
- [84] Sung H H, Yang Y L, Song Y L. *J Crustacean Biol*, 1996, 16(2): 279.
- [85] Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*)infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish& Shellfish Immunology*, 2005, 19: 293-306.
- [86] 胡成武, 李彪. 酵母细胞壁多糖在水产中的应用[J]. 中国牧业通讯. 2009, (3): 22-23.
- [87] 孙虎山, 李光友. 硒化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种水解酶活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 245-249.
- [88] 陈索丽, 陈清西. 胡天惠, 等. 长毛对虾酸性磷酸酶的纯化与性质[J]. 厦门大学学报(自然科学版). 1997, 36(1): 121-125.
- [89] 陈清西. 陈索丽, 石艳, 等. 长毛对虾碱性磷酸酶性质[J]. 厦门大学学报(自然科学版). 1996, 35(2): 257-261.
- [90] Söderhäll K. Cerenius L Johansson M W . The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense[J]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994, 12: 155-161.
- [91] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity [J]. *Curr. Opin. Immunol.* 1998, 10: 23-28.
- [92] Meng FL, Zhang Y Z, Kong J. The research review of prophenoloxi dase activating systems in crustacean[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(1): 110-115.
- [93] Smith VJ, Soderhall K. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev Comp Immunol*, 1991(15): 251-261.
- [94] 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.
- [95] Soderhall K, Hall L. lipopolysaccharide induced activation of the prophnoloxidase activating system in crayfish haemocyte. *Biochem Biophys Acat*, 1984, 797: 99-104.
- [96] 王雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究. 海洋与湖沼[J], 1995, 26(1): 34-41.
- [97] 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): 113-118.
- [98] Siwicki A K, Anderson D P and Rumsey GL. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non—specific immunity and protection against furunculosis[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , 1994, (41): 125-139.
- [99] 杨先乐. 南美白对虾的疾病及其控制[J]. 渔业现代化. 2002, 3: 6-9.
- [100] 威兰, 柯慧芬, 郑春燕等. 日本沼虾和南美白对虾免疫因子的比较研究[J]. 绍兴文理学院学报. 2003,

23(10): 65-67.

- [101] 何南海. 对虾免疫功能指标的建立及其应用[J]. 厦门大学学报(自然科学版). 2004, 43(3): 385-388.
- [102] 胡成武, 李彪. 酵母细胞壁多糖在水产中的应用[J]. 中国牧业通讯. 2009, (3): 22-23.
- [103] Jorgensen J B, Sharp G J E, Secombes C J, *et al.* Effect of yeast-cell-wall on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages[J]. Fish Shellfish Immunol. 1993, (3): 51-58.
- [104] 郭亮, 李德发. 饲料免疫增强剂的研究进展[J]. 饲料研究. 2002. (12): 7-9.
- [105] 许第新, 姚娟, 陈昌福. 注射免疫多糖(酵母细胞壁)对克氏原螯虾几种免疫相关酶的影响[J]. 安琪酵母专栏. 2004.
- [106] Yukio Y, Eizo N *et al.* Comparative studies on particulate acid phosphatases in sea urchin eggs. Comp. Biochem, Biophys. 1982, 71B: 563-567.
- [107] 张辉, 张海莲. 碱性磷酸酶在水产动物中的作用[J]. 河北渔业. 2003, (5): 12-13.
- [108] Hashimoto T, Ohno N, Yadomae T. Subgrouping immunomodulating β -glucans by monitoring IFN- γ and NO syntheses. Drg Develop Res, 1997, 42(1): 35-40.

附 录

攻读硕士期间撰写的相关论文:

王芳, 许燕, 孙静秋. 凡纳滨对虾病虾体内 SOD 和 PPO 同工酶表型的变化[J]. 上海师范大学学报 (自然科学版), 2011, 40 (1): 85-89.

论文独创性声明

本论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人或机构已经发表或撰写过的研究成果。其他同志对本研究的启发和所做的贡献均已在论文中做了明确的声明并表示了谢意。

作者签名：王芳 日期：2011.5.26

论文使用授权声明

本人完全了解上海师范大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其它手段保存论文。保密的论文在解密后遵守此规定。

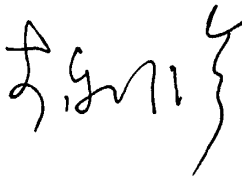
作者签名：王芳 导师签名：王芳 日期：2011.5.26

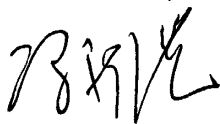
本论文经答辩委员会全体委员审查，确认符合上海
师范大学硕（博）士学位论文质量要求。

答辩委员会签名：

主席（工作单位、职称）：

委员：





导师：

