

文章编号:1000 - 0615(2005)03 - 0350 - 06

## 双歧杆菌细胞壁肽聚糖的分离及其 对二种海产动物免疫活性的影响

宋晓玲<sup>1</sup>, 杨绪彤<sup>2</sup>, 偲瀚文<sup>2</sup>, 王秀华<sup>1</sup>, 周 进<sup>3</sup>, 陈国福<sup>3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

3. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:**采用三氯乙酸裂解法分离双歧杆菌细胞壁肽聚糖,得到的肽聚糖约占双歧杆菌细胞干重的 8.4%,其中总糖含量约为 24.2%,脂肪酸含量约为 3.2%,蛋白质含量约为 2.4%;氨基酸含量及组分分析结果显示:与 N-乙酰胞壁酸羧基连接的肽链上的甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸和丙氨酸间的摩尔比为 1 0.7 1.1 6.7。将所得肽聚糖经超声波破碎后,制成 0.1%和 1%两种浓度的悬液,并将相应的缓冲液设置为对照组,分别注射给日本对虾和牙鲆,测定其对日本对虾和牙鲆血清酚氧化酶(PO)、超氧化物歧化酶(SOD)、碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)和溶菌酶(LSZ)5种免疫酶活性的影响。结果显示:肽聚糖可显著提高日本对虾血清内的 PO 活性和 LSZ 活性,并在 96 h 内一直维持在较高水平;肽聚糖可适当提高日本对虾血清 SOD 活性,但到 72 h 又降回原来的水平;肽聚糖可影响日本对虾血清的 ALP 活性和 ACP 活性,且两种作用趋势相近,96 h 内呈逐渐平缓上升的趋势。肽聚糖可显著提高牙鲆血清的 LSZ 活性,但这种升高具有明显的时效性,72 h 后降至原来的水平,且不同浓度的作用效果也有差异。由此可见,肽聚糖可作为免疫增强剂用于提高养殖日本对虾和牙鲆的非特异性免疫水平。

**关键词:**日本对虾;牙鲆;双歧杆菌;肽聚糖;免疫酶活性

**中图分类号:**S948 **文献标识码:**A

## Peptidoglycan isolation from *Bifidobacterium thermophilum* and its effect on immuno-enzymetic activity of *Penaeus japonicus* and *Paralichthys olivaceus*

SONG Xiao-ling<sup>1</sup>, YANG Xu-tong<sup>2</sup>, CAI Han-wen<sup>2</sup>, WANG Xiu-hua<sup>1</sup>, ZHOU Jin<sup>3</sup>, CHEN Guo-fu<sup>3</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Ocean Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Peptidoglycan (PG) was isolated from *Bifidobacterium thermophilum* by TCA extracting, and its weight was 8.4% of dry weight of bacterium. The peptidoglycan contained 24.2% glycan, 3.2% fatty acid and 2.4% protein. The concentrations of Gly, Glu, Lys and Ala, the special amino acid of PG, were 157.2, 102.0, 173.8 and 1 061.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectively. After chemical composition of PG was analyzed, the biological activities of PG were examined too. Effects of PG, which had been diluted to 0.1% and 1% by special buffer and broken up by ultrasonic waves, on the activity of Phenoloxidase (PO), Superoxide Dismutase (SOD), Alkaline phosphatase (ALP), Acid phosphatase (ACP) and Lysozyme (LSZ) of the serum of penaeid shrimp, *Penaeus japonicus* were studied. The results showed that the activity of PO and LSZ had been markedly enhanced and it could maintain in 96 h, the activity of SOD had been enhanced properly and it would decline back in 72 h, after ip PG. The effects of PG on the activity of ACP and ALP were similar, the enzyme activity was mildly increased in 96h. Except *Penaeus japonicus*, *Paralichthys olivaceus* were used as experiment animal too. PG could enhance the activity of SOD of fish serum significantly, but this activity was obviously different as time extending and it fell to the original value after 72 h passed. And different concentrations of PG had different effects. The

收稿日期:2004-02-24

资助项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2003AA622060)

作者简介:宋晓玲(1962-),女,河北宣化人,副研究员,硕士,主要从事水产养殖动物疾病学研究。Tel:0532-5823062; Email:songxl

@ysfri.ac.cn

results indicate that PG can be used as immunostimulant in order to enhance the non-specific immune activity of aquatic shrimps and fishes.

**Key words:** *Penaeus japonicus*; *Paralichthys olivaceus*; *Bifidobacterium thermophilum*; peptidoglycan (PG); immunoenzymatic activity

肽聚糖(peptidoglycan, PG)是细菌细胞壁的主要组成成分,是由聚糖链、肽亚单位和间肽桥(interpeptide bridge)组成的大分子聚合物。肽聚糖的分离可采用去垢剂高温裂解细胞,蛋白酶消化蛋白,氯仿去脂,透析获得完整肽聚糖<sup>[1]</sup>;也可采用三氯乙酸热裂解细胞,蛋白酶消化蛋白,丙酮去脂,而获得粗制肽聚糖<sup>[2]</sup>。肽聚糖的最小结构单位——胞壁酰二肽及其类似物,可对免疫系统产生不同的免疫调节作用<sup>[3]</sup>。肽聚糖作为一种新型的非特异性免疫增强剂,可用来提高水产养殖动物免疫活性和抗细菌、病毒感染<sup>[4-7]</sup>。

目前,海水养殖鱼类和虾类动物免疫功能的激活与维持,以及免疫增强剂的研制与开发尚处于起步阶段。本实验使用三氯乙酸裂解法分离出双歧杆菌细胞壁肽聚糖,在确定了它的主要组分及含量后,选择日本对虾和牙鲆两种重要海水养殖动物为实验材料,比较肽聚糖对其血清主要免疫酶的活性的影响,以期为肽聚糖的筛选、研制以及进一步的应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 双歧杆菌细胞壁肽聚糖的制备

参考孟凡伦等<sup>[2]</sup>改进的 Park 方法。取实验室常规厌氧培养并离心收集的双歧杆菌(*Bifidobacterium thermophilum*)湿菌 20 g,悬浮于 200 mL 10% 三氯乙酸(TCA)溶液中,沸水浴 20 min,冷却后,以  $7\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速离心 10 min,弃上清液,蒸馏水洗沉淀 3 次。

沉淀溶于 trypsin-phosphate 缓冲液(1 mg·mL<sup>-1</sup>, Trypsin; 0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS; pH 8.0)中,37℃ 水浴振荡 3 h,以  $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速离心 30 min,弃去沉淀。

上清液以  $22\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速离心 10 min,沉淀用蒸馏水洗两次,加入无水乙醇以  $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速离心 30 min,取上清。上清液加入乙醚去脂,以  $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速离心 30 min,低温干燥脱水后得淡褐色胶质肽聚糖粗制物。

### 1.2 双歧杆菌细胞壁肽聚糖的组分测定

**总糖含量的测定** 配制 40 mg·mL<sup>-1</sup> 的肽聚糖,超声波破碎后,酚硫酸法测定样品总糖含量

(%)。

**脂肪酸含量测定** 将 100 mg 肽聚糖于甲醇-苯(1:1 V/V)的 2.5% KOH 溶液中皂化 6 h,冷却后用 10% HCl 酸化,用乙醚抽提 3 次后混合乙醚提取物,蒸馏水洗涤 3 次,用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥蒸发除去乙醚冷冻干燥,之后的重量级为脂肪酸含量(%)。

**蛋白质含量的测定** 以牛血清白蛋白为标准蛋白,考马斯亮蓝 G250 为染液,Bradford 法定肽聚糖粗制物的蛋白质含量(%)。

**氨基酸组分分析** 氨基酸的测定方法采用国家标准 GB/T 14965-1994。使用仪器为:日立 835-50。分析条件分别为:分离柱,2.6 mm×150 mm;树脂, No. 2619;温度, 53℃;压力, 85 kg·cm<sup>-2</sup>;流速, 0.22 mL·min<sup>-1</sup>。

### 1.3 双歧杆菌细胞壁肽聚糖的扫描电镜观察

上述方法制备的肽聚糖用含 2.5% 戊二醛的 0.2 mol 磷酸缓冲液(pH 7.2)室温固定 2 h,磷酸缓冲液充分洗涤,25%、50%、70%及 100%乙醇系列脱水,铂钨镀膜,扫描电镜观察<sup>[1]</sup>。

### 1.4 双歧杆菌细胞壁肽聚糖免疫活性测定

#### 1.4.1 实验材料

**日本对虾(*Penaeus japonicus*)** 购于黄海水产研究所小麦岛试验基地,虾体长  $22.63\pm 0.85$  cm,连续充气暂养于各实验水槽内(每个水槽 0.12 m<sup>3</sup>)中,每日投喂沙蚕;水温 15℃;每天吸污、换水一次,换水量为 2/3。

**牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)** 购自黄海水产研究所海阳海水鱼养殖基地,牙鲆体长  $12.52\pm 1.06$  cm,连续充气暂养于各实验水族缸内(每个 0.65 m<sup>3</sup>),每日投喂“金海力”牙鲆配合饲料;水温 15℃;流水饲养。

**肽聚糖的处理** 将制备的肽聚糖干燥物分别用对虾生理缓冲液<sup>[8]</sup>和 0.85% 的生理盐水配成 0.1% 和 1% 两个浓度,超声波破碎制成均匀悬液,高温高压灭菌 20 min 后备用。

#### 1.4.2 实验方法

**实验分组** 选取暂养 1 周健康日本对虾 9 尾,分为 3 组,每组 3 尾。每组日本对虾第二腹节分别注射对虾生理盐水(对照组)、0.1% PG、1%

PG,每尾注射0.2 mL。选取暂养2周健康牙鲈24尾,分为3组,每组8尾;每组牙鲈腹腔分别注射0.85%生理盐水(对照组)、0.1%PG、1%PG,每尾注射0.1 mL。

**血清的获得** 于注射后3、24、48、72、96 h,用1 mL一次性注射器自对虾第五步足基部血窦处采血,置1.5 mL无菌Eppendorf管中,血样随即放入冰盒并于4℃冰箱放置过夜,分离血清用于免疫指标的测定。于注射后24、48、72、96 h分别从每组牙鲈中随机捞取两尾,使用1 mL一次性注射器自尾静脉取血,置于1.5 mL Eppendorf管中。血样随即放入冰盒并于4℃冰箱放置过夜,分离血清用于免疫指标的测定。

**酚氧化酶(PO)活力测定** 在酶标板中加入200  $\mu\text{L}$ 的0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH为6.0的磷酸钾盐缓冲液,10  $\mu\text{L}$ 的0.01 mol  $\text{L}^{-1}$ 的L-dopa及10  $\mu\text{L}$ 血清,于室温下混匀,每间隔4 min读取在490 nm波长下的光密度值( $\text{OD}_{490\text{nm}}$ )。酶活力定义为实验条件下每分钟OD值增加0.001为一个酶活力单位。即PO活力单位=(读数2-读数1)  $\times$  1000。读数1为反应体系初始 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 值,读数2为4 min后的 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 值。

**超氧化物歧化酶(SOD)活力测定** 用超氧化物歧化酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所生产)测定。SOD活力定义为每毫升反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD的量为1个亚硝酸盐单位( $\text{NU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

**碱性磷酸酶(ALP)活力测定** 用碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定,ALP活性定义为100 mL血清在37℃与底物作用15 min产生1 mg酚为1个金氏单位(King's unit)。

**酸性磷酸酶(ACP)活力测定** 用酸性磷酸酶测定试剂盒测定(南京建成生物工程研究所),ACP活性定义为100 mL血清在37℃与底物作用30 min产生1 mg酚为1个金氏单位(King's unit)。

**溶菌酶(LSZ)活力测定** 以溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*)冻干粉为底物,用0.1 mol  $\cdot$  L pH 6.4的磷酸钾盐缓冲液配底物悬液( $\text{OD}_{570\text{nm}}$  0.3),取200  $\mu\text{L}$ 该悬液与20  $\mu\text{L}$ 待测血清于96孔酶标板中混匀,于570 nm处测定其 $A_0$ 值。然后将酶标板取出,置于37℃水浴中温浴10 min,而后立即置冰浴中10 min以中止反应,再测其A

值。溶菌活力( $X_{\text{LSZ}}$ )按下式计算: $X_{\text{LSZ}} = (A_0 - A) / A$ 。

## 2 结果

### 2.1 双歧杆菌细胞壁肽聚糖的组分及含量

经TCA裂解、蛋白酶消化、乙醇沉淀、乙醚去脂等分离步骤,可由4 g(细胞干重)双歧杆菌细胞获得粗制肽聚糖0.3 g,获得率约为7.5%;整个分离过程可在8 h内完成。所得肽聚糖的总糖含量约为24.2%,脂肪酸含量约为3.2%,蛋白质含量约为2.4%。

氨基酸组分及含量见表1,其中丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸和甘氨酸是双歧杆菌肽聚糖与N-乙酰胞壁酸羧基连接的肽链上的氨基酸分子,甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸和丙氨酸间的摩尔比为1:0.7:1.1:6.7。

表1 TCA裂解法分离的肽聚糖的氨基酸组分及含量

Tab.1 Amino acids and contents of the peptidoglycan from *Bifidobacterium thermophilum* by TCA lysing

名称 amino acid		含量 [g $\cdot$ (100g) $^{-1}$ ] weight	分子量 molecular weight	摩尔浓度 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) molarity
丙氨酸	Ala	0.945	89.06	1 061.08
缬氨酸	Val	0.479	117.09	409.09
异亮氨酸	Ileu	0.423	131.11	322.63
苏氨酸	Thr	0.4	119.18	335.63
亮氨酸	Leu	0.336	131.11	256.27
赖氨酸	Lys	0.254	146.13	173.82
谷氨酸	Glu	0.15	147.08	101.99
色氨酸	Trp	0.124	204.11	60.75
脯氨酸	Pro	0.12	115.08	104.28
甘氨酸	Gly	0.118	75.05	157.23
苯丙氨酸	Phe	0.102	165.09	61.78
丝氨酸	Ser	0.092	105.06	87.57
天门冬氨酸	Asp	0.0598	133.6	44.76
精氨酸	Arg	0.006	174.4	3.44
酪氨酸	Tyr	0.005	181.09	2.76
蛋氨酸	Met	0.001	149.15	0.67
组氨酸	His	0.001	155.09	0.64
合计	total	3.6158		3 184.39

### 2.2 双歧杆菌细胞壁肽聚糖的扫描电镜观察

分离的双歧杆菌肽聚糖扫描电镜照片见图1。由于三氯乙酸可将细胞裂解,从电镜照片来看,分离的肽聚糖基本失去原有细胞壁外型,且产生较多碎片。

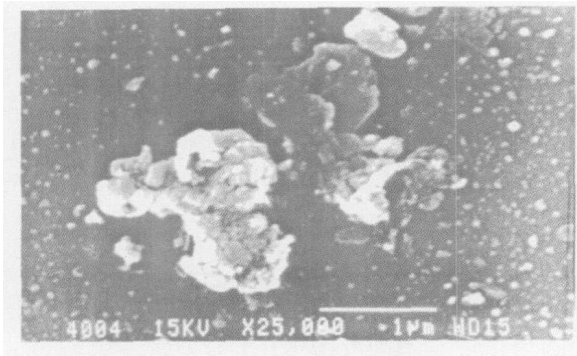


图 1 分离的双歧杆菌细胞壁肽聚糖的扫描电镜照片  
Fig.1 Peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum* on scan electron microscope

### 2.3 双歧杆菌细胞壁肽聚糖的免疫活性

#### 2.3.1 肽聚糖对日本对虾血清免疫酶活性的影响

**PO** 注射 1% 肽聚糖的日本对虾血清的 PO 活性在 3 h 后达到最高值,以后呈明显下降趋势(图 2-A),且这组对虾血清 PO 活性显著高于其它 2 组对虾血清的 PO 活性;注射 0.1% 肽聚糖的日本对虾血清的 PO 活性与对照组相近,差异不明显。

**SOD** 日本对虾注射肽聚糖后,其血清 SOD 活性迅速上升,并在 24 h 达到最高值,以后又迅速回落,到 72h SOD 活性接近于对照组对虾血清的 SOD 活性(图 2-B);其中 1% 肽聚糖注射

组 SOD 的活性要高于 0.1% 肽聚糖注射组的 SOD 活性。

**ACP** 日本对虾注射肽聚糖后,其血清 ACP 在 3 h 内各有个陡升的过程,以后呈逐渐平缓上升趋势(图 2-C);注射肽聚糖组的 ACP 活性显著高于对照组对虾血清的 ACP 活性,且 1% 注射组要高于 0.1% 注射组对虾血清的 ACP 活性。

**ALP** 日本对虾注射肽聚糖后,其血清 ALP 在 48 h 内逐渐升高,以后趋于平缓(图 2-D);其中 1% 肽聚糖注射组日本对虾血清的 ALP 活力在 48h 内逐渐升高,48 h 后趋于平缓;日本对虾注射 0.1% 肽聚糖后,其血清 ALP 活力在 72 h 内逐渐升高,72 h 后趋于平缓;注射肽聚糖组的 ALP 活性显著高于对照组对虾血清的 ALP 活性,且 1% 注射组要高于 0.1% 注射组。

**LSZ** 注射肽聚糖 3 h 后 LSZ 活性迅速升至最高值,3~24 h 下降,以后逐渐趋于平缓(图 3-A);注射浓度为 1% 肽聚糖的日本对虾的 LSZ 活性显著高于 0.1% 注射组对虾血清的 LSZ 活性,且注射肽聚糖组的 LSZ 活性都高于对照组日本对虾的 LSZ 活性。说明日本对虾注射肽聚糖后,特别是短时间内,对血清中的 LSZ 活性产生明显的增强作用。

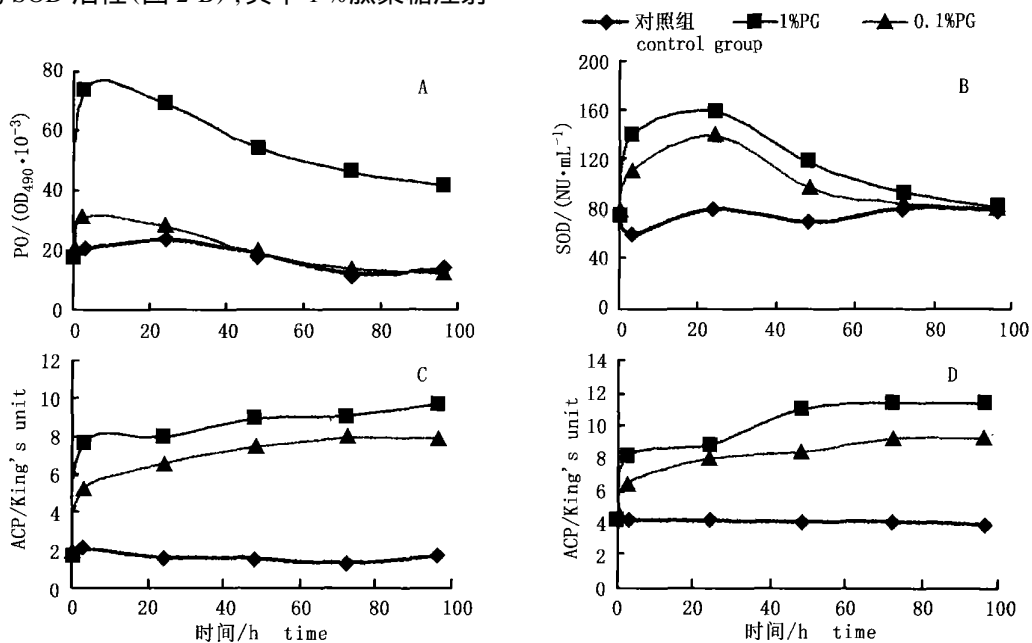


图 2 注射肽聚糖后日本对虾血清免疫酶活性的比较

Fig. 2 The immunoenzymatic activity of *P. japonicus* serum after injecting PG

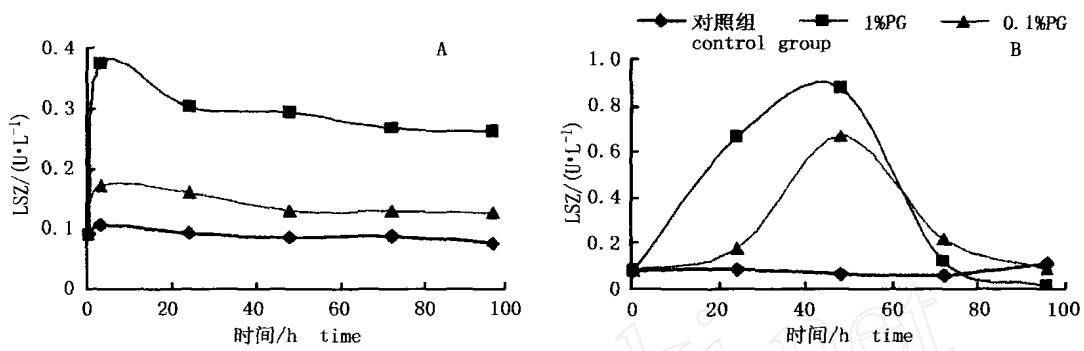


图3 注射肽聚糖后日本对虾和牙鲆血清的溶菌酶活性

Fig. 3 LSZ activity of the serum of *P. japonicus* and *P. olivaceus* after injecting PG

A: *P. japonicus*, B: *P. olivaceus*

### 2.3.2 肽聚糖对牙鲆血清LSZ活性的影响

牙鲆注射肽聚糖后其血清的LSZ活性迅速上升,并在48 h达到最高值,以后又迅速下降,并在96 h甚至降至对照组之下(图3-B);肽聚糖注射组与对照组牙鲆血清LSZ活性相比形成一明显的峰,1%肽聚糖注射组的峰高要高于0.1%肽聚糖组注射组牙鲆血清的LSZ活性。

## 3 讨论与结语

细菌细胞壁肽聚糖最多采用的是由Sekine建立的方法制备,由于条件温和,由这种方法制备的肽聚糖具有结构完整等优点,常用于肽聚糖结构、组分、生物学功能的分析;但这种方法实验步骤繁琐、耗时长,一套流程至少需要2周的时间<sup>[1]</sup>。本实验采用的肽聚糖制备方法,步骤简单,1 d即可由细菌培养物获取粗制肽聚糖,但制备的肽聚糖空间结构被破坏,其细胞壁骨架外形不再为一袋状结构,呈皱褶紧缩状。由于本实验的研究目的是考察肽聚糖对水产养殖动物非特异免疫能力的影响,而多糖的免疫促进作用与多糖的分子质量有关,分子质量越大,分子体积越大,不利于多糖跨越多重细胞膜障碍进入生物体内发挥生物学活性<sup>[9]</sup>,因而保持肽聚糖结构的完整性不是本研究的目的。本研究在注射前,对纯化的肽聚糖进行超声破碎,以助于其溶解,也在一定程度地降解肽聚糖、降低其分子质量,进而提高其活性效果。

一般认为微生物多糖是一类带有多种复杂基团的生物聚合物,能作为免疫增强剂激活非特异性免疫系统。通常这些聚合物是微生物进化过程保留下来的特定序列结构,但不是高等生物体的

组成成分。聚合物能对动物产生免疫调节作用,其原因是这类聚合物分子,如肽聚糖、脂多糖、磷壁酸等,所共有的、保守的、不同于宿主自身成分的结构模式可被宿主的天然识别分子所识别,由于这种结构模式不是高度专一,因而是广谱的<sup>[10]</sup>。本实验以肽聚糖作为免疫增强剂对日本对虾免疫功能影响的实验表明,肽聚糖可提高日本对虾血清的PO、SOD、ALP、ACP和LSZ活性。也可显著提高牙鲆血清的LSZ活性。

PO是对虾体内与抗病相关的主要酶类之一,以酚氧化酶原的形式存在于血细胞中,可被微量微生物多糖激活,活化过程中产生的一系列活性物质通过多种方式参与宿主的防御反应,如促进血细胞吞噬作用、包裹作用、结节形成,介导凝集,产生杀菌物质(如黑色素)等<sup>[11]</sup>。本实验结果证实,日本对虾注射1%肽聚糖后可以显著提高对虾血淋巴中的PO活性,对提高日本对虾非特异免疫有良好效果;而注射0.1%肽聚糖对血清PO活性的影响就弱了许多。

SOD是生物体内唯一一种以自由基为底物的酶,在清除自由基、防生物分子损伤方面有十分重要的作用<sup>[12]</sup>。本实验发现,日本对虾注射肽聚糖后短时间内其血清SOD活性有所增加,但到约72 h以后,与对照组已无明显差别,说明注射肽聚糖对提高日本对虾SOD活力具有时效性,这一结果与其他文献报道的结果类似<sup>[2]</sup>。

ACP是溶酶体的标志酶,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢,从而提高机体的解毒免疫功能和防病能力。ALP是生物体内的一种重要的代谢调控酶,直接参与磷代谢,对钙质吸收、骨骼

形成、磷酸钙沉积、甲壳素分泌及形成有重要的作用<sup>[13]</sup>。本实验证实,日本对虾注射肽聚糖后,血清 ALP 的变化趋势与 ACP 的变化趋势相类似,在 96 h 内一直呈稳定上升的趋势,这可能与这两种酶的作用机制相类似有关。实验显示,96 h 时 ACP 的活性比对照组提高 4.7~5.7 倍,但 96 h 时 ALP 的活性比对照组提高 2.3~2.8 倍,也就是 ACP 的增值比 ALP 明显,这与刘树青等<sup>[13]</sup>报道的结果不同,这可能是由多糖的种类不同所造成的。

LSZ 是非特异性免疫系统的重要成员,在特异性免疫系统尚不完善的甲壳类中尤为重要,其具有的溶菌作用与机体的免疫防御有很大关系。中国对虾注射甘露糖醛酸后,其血清 LSZ 活性 24 h 达到最高值<sup>[14]</sup>,注射海藻多糖和北虫草多糖、真菌多糖后,中国对虾血清的 LSZ 活性在 48 h 达到最高值<sup>[13]</sup>,日本对虾在 96 h 达到最高值<sup>[15]</sup>。综合以上报道,虽然在 LSZ 活性高峰时间上有差异,但在维持时间较长达到共识。本实验注射肽聚糖后,日本对虾血清 LSZ 活性迅速增加,并在 2 h 达到最高值,且能长时间维持较高水平,与孟凡伦等<sup>[2]</sup>报道的结果相近。LSZ 活性对肽聚糖的敏感性也表现在牙鲆血清中,在 48 h 达到最高值,96 h 时甚至降到对照组数值之下。

综上所述,双歧杆菌细胞壁粗制肽聚糖注射给予日本对虾和牙鲆,可提高其血清的 PO、SOD、ALP、ACP、LSZ 活性,且不同的给予剂量对免疫酶活性的促进作用不同,不同的作用时间作用效果也不尽相同。从而说明该肽聚糖可作为非特异性免疫增强剂,用于提高养殖对虾和牙鲆的非特异性免疫力,并存在着最佳使用剂量和有效持续时间。通过注射的方法,可以短时间内确定肽聚糖对日本对虾和牙鲆免疫指标的影响及变化规律,为免疫增强剂的筛选、研制以及进一步的应用提供理论依据。不过在注射或取血时对动物造成的伤害,或者引起动物的应激反应会降低所得数据的客观度。具体应用时还应采取其他缓和的给与方式,如口服等来进一步获得使用剂量、持续使用时

间、使用时机等应用技术参数。

感谢农业部水产品质量检测中心李兆新研究员在氨基酸组分分析、青岛大学医学院谭金山教授在扫描电镜制样与观察上给予的大力帮助。

#### 参考文献:

- [1] 乐军,胡宏. 双歧双歧杆菌细胞壁完整肽聚糖的分离纯化[J]. 中国微生物学杂志, 1997, 9(5): 10 - 14.
- [2] 孟凡伦,马桂荣,孔健. 乳链球菌 SB900 胞壁肽聚糖的部分生物学活性[J]. 微生物学报, 1998, 38(5): 376 - 380.
- [3] 王秀华,黄瑾,宋晓玲. 免疫增强剂 - 肽聚糖在对虾养殖中的应用[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(1): 69 - 74.
- [4] Matsuo K, Miyazono I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1993, 59: 1377 - 1379.
- [5] Itami T, Kondo M, Uozu M, et al. Enhancement of disease resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail *Seriola quinqueradiata* Temminck and Schlegel by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum* [J]. J Fish Dis, 1996, 19: 185 - 187.
- [6] Itami T, Asano M, Tokushige K, et al. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp *Penaeus japonicus* after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum* [J]. Aquac, 1998, 164: 277 - 288.
- [7] Boonyaratpalin S, Boonyaratpalin M. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. Diseases in Asian Aquaculture, 1995, 468 - 477.
- [8] Huang J, Song X L, Yu J, et al. The components of an inorganic physiological buffer for *Penaeus chinensis* [J]. Methods in Cell Science, 1999, 21: 225 - 230.
- [9] Raa J, Roerstad G, Engstad R, et al. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections [C]. Diseases in Asian Aquaculture, edited Shariff I M, Subsinghe R P, Arthur J R, Asian Fisheries Society, Manila, Phillipines, 1992. 39 - 50.
- [10] 马洪明, 麦康森. 贝类血细胞的吞噬作用和非我识别[J]. 海洋科学, 2003, 27(2): 16 - 18.
- [11] Sritunyalucksana K, Sithisarn P, Withayachumnarnkul B, et al. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9: 21 - 30.
- [12] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学, 1995, 4: 1 - 3.
- [13] 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]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278 - 283.
- [14] 刘岩, 江晓路, 吕青, 等. 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 - 563.
- [15] 江晓路, 刘树青, 牟海津, 等. 真菌多糖对中国对虾血清及淋巴细胞免疫活性的影响[J]. 动物学杂志, 1999, 20(1): 41 - 45.