

文章编号: 1000-0615(2006)05-0683-07

柱状黄杆菌胞外多糖对草鱼的免疫促进作用

刘毅^{1,2,3}, 谢海侠¹, 昌鸣先¹, 隗黎丽¹, 姚卫建¹, 聂品¹

(1. 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 中国科学院水生生物研究所, 湖北武汉 430072;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 江西师范大学生命科学院, 江西南昌 330022)

摘要 将柱状黄杆菌胞外多糖(EPS)溶液经腹腔注射免疫草鱼,以注射灭菌生理盐水作对照。免疫一周后,分别提取受免鱼与对照鱼肝脏、脾脏、体肾和头肾4种组织中的总RNA,并通过RT-PCR半定量的方法检测不同组织中C-反应蛋白(CRP)、白介素-1(IL-1)、主要组织相容性复合体Ⅰ(MHC I)、免疫球蛋白M(IgM)、干扰素(IFN)等5种免疫基因的表达情况。结果显示,CRP在受免鱼肝脏中的表达显著上升;MHC I在受免鱼脾脏、体肾中的表达显著下降,IgM在受免鱼4种组织中的表达皆显著上升;IL-1在受免鱼4种组织中的表达与对照组没有显著差异,无论受免组还是对照组都只能检测到微弱的IFN表达,且两组之间没有显著差异。结果表明,柱状黄杆菌EPS对草鱼的先天免疫能力以及特异性体液免疫能力具有促进作用。

关键词 胞外多糖;柱状黄杆菌;草鱼;免疫促进;免疫基因

中图分类号 S 963 文献标识码 A

Immunologic enhancement of *Flavobacterium columnare* exopolysaccharide in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*

LIU Yi^{1,2,3}, XIE Hai-xia¹, CHANG Ming-xian¹, WEI Li-li¹, YAO Wei-jian¹, NIE Pin¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;
2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;
3. College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: The immunologic enhancement of *Flavobacterium columnare* exopolysaccharide (EPS) was examined by semi-quantitative RT-PCR in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) immunized with intraperitoneal injection of EPS. The total RNA was extracted from liver, spleen, trunk and head kidney of EPS- and saline-injected fish and reverse-transcribed into cDNA, respectively. Five immune genes, i. e. CRP, IL-1, MHC I, IgM and IFN were then amplified through polymerase chain reaction and semi-quantified by comparing brightness of electrophoresis band of the gene PCR product with that of β -actin, respectively. The gene expression of CRP in liver of immunized fish increased significantly, and gene expression of MHC I in spleen and trunk kidney of immunized fish decreased significantly in comparison with control fish. No significant change was observed in the gene expression of IL-1 between immunized and control fish, and the gene expression of IFN was weakly detected in tissues of both immunized and control fish with no significant difference observed. However, the gene expression of IgM in four tissues of immunized fish increased significantly when compared with control fish. It is thus indicated that the innate and specific humoral immunity of grass carp are effectively activated by immunization with EPS of *F. columnare*.

Key words: exopolysaccharides; *Flavobacterium columnare*; *Ctenopharyngodon idellus*; immunologic enhancement; immune gene

收稿日期 2005-08-25

资助项目: 中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCX2-SW-302); 国家自然科学基金资助项目(30130150, 30025035)

作者简介: 刘毅(1971-)男,江西九江人,在职博士研究生,从事鱼类免疫学研究。Tel: 027-68780001, E-mail: yiliusan@sina.com

通讯作者: 聂品, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

细菌的多糖成分多以3种形式存在,其中,与细胞膜结合的为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),与细胞壁共价连接的为荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS),完全分泌到胞外的多糖成分称为胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)^[1]。在3种多糖成分中,细菌LPS对鱼类的免疫促进作用已有较详细的报道^[2,3]。尽管近来有研究表明,细菌EPS对小鼠具有免疫促进作用^[4]、抗肿瘤作用^[5]以及降低胆固醇的功能^[6],细菌EPS对对虾也存在免疫促进作用^[7],但细菌EPS对鱼类是否具有免疫促进作用则不为所知。柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)所引发的草鱼烂鳃病是危害草鱼的主要细菌性疾病之一。对于该菌的免疫学研究,国内外已经有一些报道,多集中在对该菌的LPS及外膜蛋白成分对鱼体的免疫保护作用等方面^[8,9],而对于该菌EPS的免疫促进作用,则在国内外都未见报道。本研究通过提取柱状黄杆菌的EPS,将其经腹腔注射进草鱼体内免疫一周后,利用RT-PCR半定量方法检测受免鱼以及对照鱼5种免疫基因的表达情况,以揭示该菌EPS对草鱼是否具有免疫促进作用。

1 材料与方法

1.1 细菌的培养

菌株由中国科学院水生生物研究所提供。细菌在25℃条件下于Shieh培养基(1L培养液中,含蛋白胨5g,酵母粉0.5g,0.01g CH₃COONa·3H₂O,0.01g BaCl₂·2H₂O,0.1g K₂HPO₄,0.05g KH₂PO₄,0.3g MgSO₄·7H₂O,0.0067g CaCl₂·2H₂O,0.001g FeSO₄·7H₂O,0.05g NaHCO₃,pH 7.2)中振荡培养48h。

1.2 EPS的制备

柱状黄杆菌EPS的提取按照Harding等^[10]的方法进行。往1L培养好的细菌培养液中加入80%三氯乙酸至终浓度14%,离心30min(25000g,4℃),弃沉淀,上清中加入同等体积的冰乙醇,-20℃过夜。离心25min(25000g,4℃),将沉淀溶解于100mL超纯水中,加入同等体积冰乙醇,-20℃过夜,离心后将沉淀溶解于20mL超纯水,装入透析膜中对超纯水4℃下透析72h,每天换水3次。冻干,备用。

1.3 实验鱼

本实验所用草鱼购自武汉市江夏区牛山湖渔场。选取外观健康、体重为25~30g的草鱼,于2个85cm×55cm×52cm的塑料水族箱中驯养。每个水族箱中放养3尾草鱼,每天定时投喂相当于鱼体重量1%的配合饵料。用增氧泵增氧。驯养14d后开始试验。试验期间控制水温在(20±1)℃。

1.4 免疫注射

将冻干的EPS用无菌生理盐水稀释至1mg·mL⁻¹,经胸鳍基部给第1组草鱼每尾注射EPS溶液0.1mL,第2组每尾注射无菌生理盐水0.1mL作为对照。

1.5 总RNA提取

免疫一周后将草鱼杀死,取肝、脾、体肾和头肾,用PBS(pH 7.2)洗涤3次后,置于液氮中快速冷冻。用Trizol(Invitrogen)提取各组织的总RNA,每100mg组织块中加入1mL Trizol溶液,匀浆。室温静置10min,离心10min(12000g,4℃);取上清,每毫升Trizol中加入0.2mL氯仿,剧烈摇动15s,室温静置5min,离心15min(12000g,4℃);取上清,转移到干净的离心管中,每毫升Trizol加入0.5mL异丙醇,室温静置10min,离心10min(10000g,4℃)。沉淀用无水乙醇洗涤两次,加入无RNase的水溶解。所得RNA样品质量通过分光光度计和电泳检测。

1.6 RT-PCR

将从各组织中提取的总RNA 5μg用SuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen)逆转录合成第一链cDNA。用β-actin基因(上游引物:5'-CCTTCTTGGGTATGGAGTCTTG-3',下游引物:5'-AGAGTATTTACGCTCAGGTGGG-3')扩增逆转录合成的cDNA:50μL反应体系中加入0.5μL的逆转录产物为模板,按94℃预变性4min后,94℃30s,57℃30s,72℃1min的循环参数进行PCR。在第25,30和35个循环时各取5μL,待剩余体系完成40个循环后一起电泳,以确定免疫组和对照组各个样品的稀释倍数,使得RT-PCR时各样品的模板量基本相同,然后用基因特异的上游和下游引物进行PCR(引物序列和循环条件见表1)。RT-PCR产物用凝胶成像和分析系统(Syngene)照相并半定量分析每条带的亮度。

表 1 RT-PCR 中所用引物及其反应条件

Tab.1 PCR primers used in RT-PCR and their reaction conditions

引物名 primer name	引物序列(5'-3') sequence	方向 direction	循环参数 温度(°C) [时间(s)] cycle parameter
CRP F	GTGGATGACAATGTGTGTGAAGT	正向 forward	94(30)-58(30)-72(40)
CRP R	CGCTCTCCATCTTTCATACTCAC	反向 reverse	
IL-1 F	GGAGAATGTGATCGAAGAGCGT	正向 forward	同上 same to upper
IL-1 R	GCTGATAAACCATCCGGGA	反向 reverse	
MHC I F	CAGACTGGGTGAAGGGGATT	正向 forward	同上 same to upper
MHC I R	TCCACTGGGGTAAAAATCCTG	反向 reverse	
IgM F	CCCGCTAAGAAAGAGGTGACT	正向 forward	同上 same to upper
IgM R	GTTCTTGAAATGTGCCTCCG	反向 reverse	
IFN F	GGTGAAGTTTCTTGCCCTGACCTTAG	正向 forward	同上 same to upper
IFN R	CCTTATGTGATGGCTGGTATCGGG	反向 reverse	

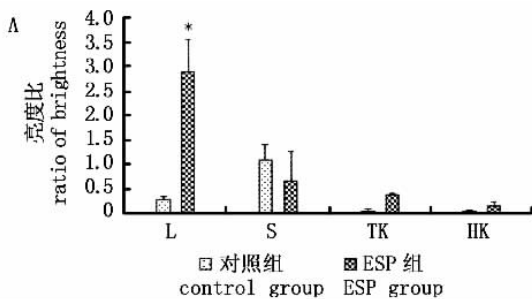
1.7 数据统计分析

以 β -actin 基因的表达作为参照, 受免组和对照组之间特异基因表达的差异用 Excel 表格中的 t -检验进行分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 CRP mRNA 在各组织中的表达

CRP 在 EPS 组和对照组各个组织中的表达



见图 1。由图 1 可知, 在对照组, 3 尾草鱼的肝脏和脾脏都检测到了 CRP, 只有 1 尾草鱼的体肾和 2 尾草鱼的头肾检测到微弱的 CRP。而在 EPS 组有 3 尾草鱼的肝脏、体肾和头肾检测到了 CRP, 有 2 尾在脾脏中能检测到 CRP。对 RT-PCR 产物的亮度分析显示 CRP 只在 EPS 组肝脏中的表达显著性地高于对照组 ($P < 0.05$)。

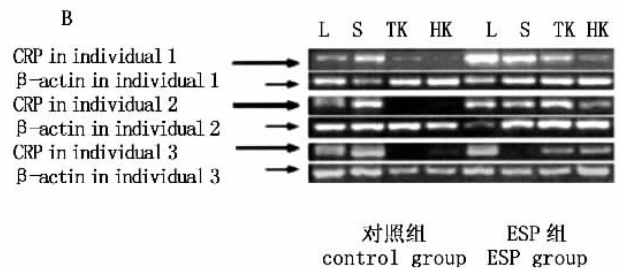


图 1 柱状黄杆菌胞外多糖对草鱼 CRP mRNA 表达水平的影响

Fig.1 Expression of CRP mRNA in grass carp injected with EPS of *F. columnare*

A 相对于 β -actin 的 CRP 的表达。显著差异 ($P < 0.05$) 用星号表示; B: RT-PCR 检测 CRP 在 3 尾 EPS 注射组和 3 尾生理盐水注射组的草鱼肝脏 (L)、脾脏 (S)、体肾 (TK) 和头肾 (HK) 中的差异表达

A: Expression of CRP relative to β -actin as determined by RT-PCR. Bars represent standard deviations from 3 fish injected with EPS and saline, respectively, with significance indicated in asterisks ($P < 0.05$); B: Different expression of CRP in different tissues of 3 fish injected each with EPS and saline by RT-PCR. Total RNA was obtained from liver (L), spleen (S), trunk kidney (TK), head kidney (HK), respectively

2.2 IL-1 mRNA 在各组织中的表达

IL-1 在 EPS 组与对照组各组织中的表达见图 2。由图 2 可知, 在对照组肝脏、脾脏、体肾和头肾中各有 3、1、2、3 尾鱼检测到了 IL-1 的表达, 在 EPS 组各组织中可能检测到它的分别是 2、2、3、3

尾鱼。统计分析表明, EPS 组与对照组比较, 各组织中 IL-1 的表达无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 MHC I mRNA 在各组织中的表达

MHC I 在各组织中的表达情况见图 3。由图 3 可知, 对照组的 4 种组织中皆检测到了 MHC I,

信号强度的强弱从大到小的排列为:体肾最强,脾脏次之,肝脏与头肾最弱。而在 EPS 组中,除了在 1 尾鱼的体肾中检测到外,在其它组织中均没

有检测到 MHC I 的表达。统计分析表明 EPS 组的体肾与脾脏中 MHC I 的表达显著性低于对照组 ($P < 0.05$)。

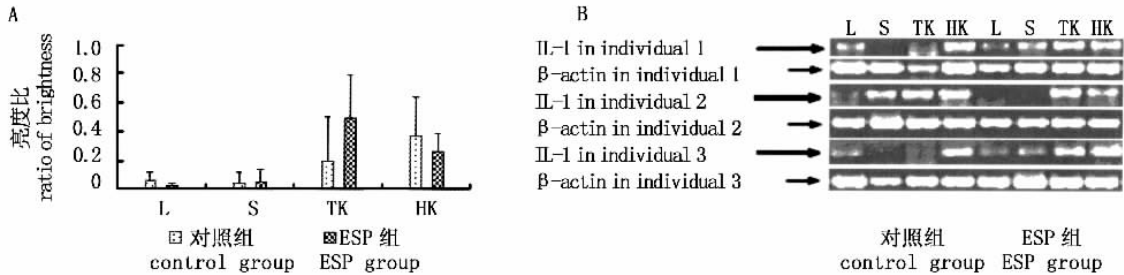


图 2 柱状黄杆菌胞外多糖对草鱼 IL-1 mRNA 表达水平的影响

Fig.2 Expression of IL-1 mRNA in grass carp injected with EPS of *F. columnare*

A 相对于 β -actin 的 IL-1 的表达。显著差异 ($P < 0.05$) 用星号表示; B: RT-PCR 检测 IL-1 在 3 尾 EPS 注射组和 3 尾生理盐水注射组的草鱼肝脏(L)、脾脏(S)、体肾(TK)和头肾(HK)中的差异表达

A: Expression of IL-1 relative to β -actin as determined by RT-PCR. Bars represent standard deviations from 3 fish injected with EPS and saline, respectively, with significance indicated in asterisks ($P < 0.05$); B: Different expression of IL-1 in different tissues of 3 fish injected each with EPS and saline by RT-PCR. Total RNA was obtained from liver (L), spleen (S), trunk kidney (TK), head kidney (HK), respectively

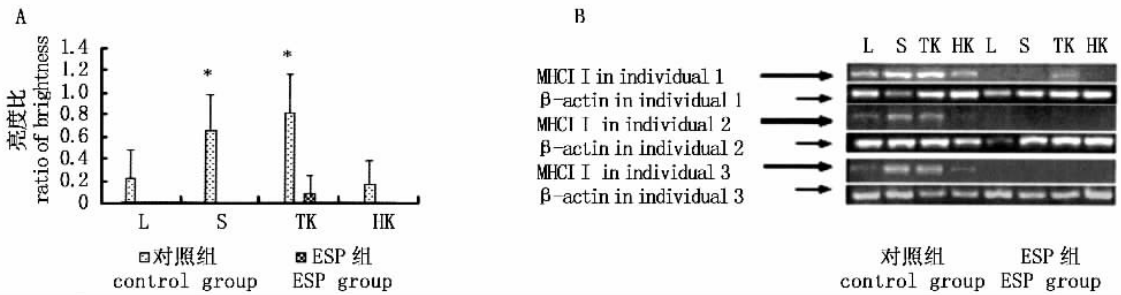


图 3 柱状黄杆菌胞外多糖对草鱼 MHC I mRNA 表达水平的影响

Fig.3 Expression of MHC I mRNA in grass carp injected with EPS of *F. columnare*

A 相对于 β -actin 的 MHC I 的表达。显著差异 ($P < 0.05$) 用星号表示; B: RT-PCR 检测 MHC I 在 3 尾 EPS 注射组和 3 尾生理盐水注射组的草鱼肝脏(L)、脾脏(S)、体肾(TK)和头肾(HK)中的差异表达

A: Expression of MHC I relative to β -actin as determined by RT-PCR. Bars represent standard deviations from 3 fish injected with EPS and saline, respectively, with significance indicated in asterisks ($P < 0.05$); B: Different expression of MHC I in different tissues of 3 fish injected each with EPS and saline by RT-PCR. Total RNA was obtained from liver (L), spleen (S), trunk kidney (TK), head kidney (HK), respectively

2.4 IgM mRNA 在各组织中的表达

IgM 在各组织中的表达见图 4。由图 4 可知, 对照组中 IgM 能检测到的鱼数很少, 在肝脏、脾脏、头肾中分别只有 1 尾、2 尾和 3 尾检测到了 IgM 的表达, 且表达的亮度很弱, 体肾中则完全没有检测到 IgM。相反, 在 EPS 组中, 在 4 种组织中能检测到 IgM 的鱼数都为 3 尾, 且亮度较强。经亮度分析显示, IgM 在 EPS 组 4 种组织中的表达皆显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.5 IFN mRNA 在各组织中的表达

IFN 在各组织中的表达见图 5。由图 5 可知, 尽管在对照组的肝、脾、头肾和体肾中各有 3、2、3 和 3 尾鱼中检测到了 IFN 的表达, EPS 组的四种组织中也各有 1、2、2 和 3 尾鱼中检测出 IFN, 但是所有的条带都很弱, 经亮度分析表明, IFN 在 EPS 组的不同组织中的表达与对照组皆没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

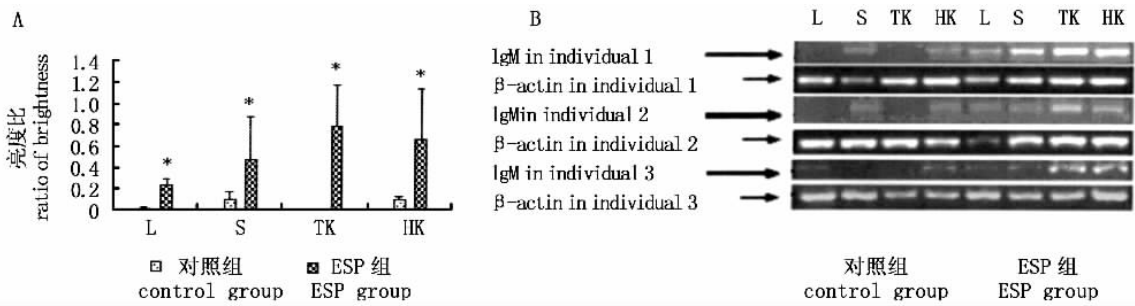


图4 柱状黄杆菌胞外多糖对草鱼 IgM mRNA 表达水平的影响

Fig.4 Expression of IgM mRNA in grass carp injected with EPS of *F. columnare*

A 相对于 β -actin 的 IgM 的表达。显著差异 ($P < 0.05$) 用星号表示 ; B : RT-PCR 检测 IgM 在 3 尾 EPS 注射组与生理盐水注射组的草鱼肝脏 (L)、脾脏 (S)、体肾 (TK) 和头肾 (HK) 中的差异表达

A : Expression of IgM relative to β -actin as determined by RT-PCR. Bars represent standard deviations from 3 fish injected with EPS and saline, respectively, with significance indicated in asterisks ($P < 0.05$); B : Different expression of IgM in different tissues of 3 fish injected each with EPS and saline by RT-PCR. Total RNA was obtained from liver (L), spleen (S), trunk kidney (TK), head kidney (HK), respectively

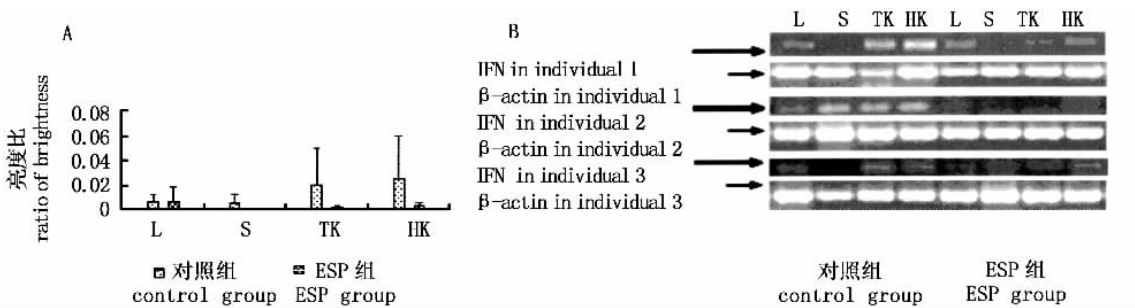


图5 柱状黄杆菌胞外多糖对草鱼 IFN mRNA 表达水平的影响

Fig.5 Expression of IFN mRNA in grass carp injected with EPS of *F. columnare*

A 相对于 β -actin 的 IFN 的表达。显著差异 ($P < 0.05$) 用星号表示 ; B : RT-PCR 检测 IFN 在 3 尾 EPS 注射组和 3 尾生理盐水注射组的草鱼肝脏 (L)、脾脏 (S)、体肾 (TK) 和头肾 (HK) 中的差异表达

A : Expression of IFN relative to β -actin as determined by RT-PCR. Bars represent standard deviations from 3 fish injected with EPS and saline, respectively, with significance indicated in asterisks ($P < 0.05$); B : Different expression of IFN in different tissues of 3 fish injected each with EPS and saline by RT-PCR. Total RNA was obtained from liver (L), spleen (S), trunk kidney (TK), head kidney (HK), respectively

3 讨论

相对于哺乳类等高等恒温脊椎动物而言,鱼类的先天免疫在抵御外界病原的过程中起着重要的作用。Ellis^[11]认为,除非是经过预先免疫过的鱼体,否则特异性的免疫对于鱼体没有保护作用。由于特异性的免疫反应需要相当长的时间,一般超过病原菌致死鱼体的时间,并且特异性免疫往往是温度依赖性的,因而对于作为变温动物的鱼类,包括溶菌酶和补体在内的先天免疫能力对于抵御外界病原显得尤为关键。C-反应蛋白是鱼体先天免疫系统的重要成分之一,它由鱼体肝脏合成并分泌到血清中,对广泛分布于细菌和真菌胞

壁的 C-多糖和磷酸胆碱有沉淀作用并通过经典途径激活鱼体的补体系统^[12]。研究表明,多种物质能够影响鱼体 CRP 的合成。Youchang 等^[13]证明,注射松节油使虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 血清中 CRP 的水平降低。Hiroshi 等^[14]发现将虹鳟浸于 30×10^{-6} 甲醛溶液 9.5 h 鱼体血清中的 CRP 比正常时水平上升了 18 倍。本研究也发现,经 *F. columnare* EPS 溶液注射 1 周后,草鱼肝脏中的 CRP 基因表达水平上升,明显高于对照组,表明 *F. columnare* EPS 对草鱼的先天免疫力有促进作用。

硬骨鱼类的头肾和脾脏是成鱼最重要的淋巴组织^[15]。在鱼类,由抗原活化的 T 淋巴细胞,特

别是 CD4⁺ 亚群会产生一些调节淋巴细胞活化、生长和分化以及促进炎症反应的细胞因子, IL-1 即是其中的一种炎症反应因子。Selvaraj 等^[16]用酵母葡聚糖注射鲤 (*Cyprinus carpio*) 7 d 后,发现鱼体肾脏中 IL-1 mRNA 的表达升高。Sigh 等^[17]用多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 感染虹鳟鱼苗 4 d 后,发现鱼体皮肤中 IL-1 β 的表达最高上升了 17.8 倍,其在鱼体头肾和脾脏中的表达也得到上调。本研究用 *F. columnare* EPS 溶液注射草鱼,与对照组相比,受免鱼的 4 种组织中 IL-1 的表达未见显著差异,表明其对鱼类炎症反应的促进作用不明显。

与哺乳类一样,鱼类也存在两种 MHC 分子,其中 MHC I 类分子结合呈递的多肽是细胞内合成的蛋白产物如病毒,而 MHC II 类分子结合呈递的多肽通常是经细胞核内体和溶酶体腔内加工处理的外源性蛋白产物^[18]。Tomokazu 等^[19]发现注射抗牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 弹状病毒的 DNA 疫苗使牙鲈体内的 MHC I 类分子的表达上升。而本研究发现,注射 *F. columnare* EPS 后,受免草鱼脾脏和体肾中 MHC I 类分子的表达水平显著低于对照草鱼,这个结果表明 *F. columnare* EPS 可能对草鱼的内源性抗原呈递能力有下调作用。本研究还显示,无论是受免组还是对照组的 4 种组织中,都只能检测到微弱的 IFN 的基因表达,且受免组与对照组之间不存在差异,由于 IFN 是特异性的抗病毒因子,因此,本研究结果表明,*F. columnare* EPS 对病毒性病原的免疫促进作用不明显。

尽管已有文献报道在鱼体内发现 IgD^[20],在鱼类 IgM 分子仍旧是其特异性体液免疫系统中最主要的免疫球蛋白。Cuesta 等^[21]发现在饲喂金头鲷 (*Sparus aurata* L.) 的饲料中分别加入维生素 A、几丁质、酵母和左旋咪唑,均显著性提高鱼体血清中的总 IgM。本试验通过注射 *F. columnare* EPS,草鱼 4 种组织中 IgM 的基因表达均显著高于对照鱼,表明 *F. columnare* EPS 可以激活草鱼的特异性体液免疫能力。

水产动物疾病的免疫防治近年来备受重视,高效的免疫佐剂是鱼类免疫学的研究热点之一,要使 *F. columnare* EPS 作为一种有效的免疫佐剂在生产实践中得到有效利用,进一步深入研究该菌 EPS 的分子结构及其产生免疫促进作用的机

理将非常必要。

参考文献:

- [1] Wang L Y, Li S T, Li Y. Identification and characterization of a new exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Streptomyces* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 220: 21–27.
- [2] Kozinska A, Guz L. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16: 437–445.
- [3] Paulsen S M, Lunde H, Engstad R E, et al. In vivo effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 1: 39–54.
- [4] Hosono A, Lee J, Ametani A, et al. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4 [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61: 312–316.
- [5] Kitazawa H, Toba T, Itoh T, et al. Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. cremoris isolated from Scandinavian ropy sour mick, 'villi' [J]. Anim Sci Technol, 1991, 62: 277–283.
- [6] Nakajima H, Suzuki Y, Kaizu H et al. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk [J]. J Food Sci, 1992, 57: 1327–1329.
- [7] Campa-Cordova A I, Hernández-Saavedra N Y, de Philippis R, et al. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide [J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12: 353–366.
- [8] 孙宝剑, 聂品. 柱状嗜纤维菌的外膜蛋白和脂多糖及其对鳊的免疫原性 [J]. 水生生物学报, 2001, 25(5): 524–527.
- [9] 陈昌福. 不同方法提取的柱状嗜纤维菌脂多糖对鲤鱼免疫活性的比较 [J]. 华中农业大学学报, 1997, 16(4): 380–385.
- [10] Harding L P, Marshall V M, Elvin M, et al. Structural characterization of a perdeuteriomethylated exopolysaccharide by NMR spectroscopy: characterisation of the novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. Bulgaricus EU23 [J]. Carbohydr Res, 2003, 338: 61–67.
- [11] Ellis A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 827–839.
- [12] Christopher J B, Lena G. The acute phase response and innate immunity of fish [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 725–743.
- [13] Youchang L, Tadashi I, Shinobu W, et al. Effect of turpentine oil on C-reactive protein (CRP) production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17: 203–210.
- [14] Hiroshi K, Yuji M, Yoshiaki T, et al. Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after

- exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture [J].
Fish Shellfish Immunol , 2004 , 16 : 589 - 597 .
- [15] 聂品 . 鱼类非特异性免疫研究的新进展 [J]. 水产学报 ,
1997 , 21(1) : 69 - 73 .
- [16] 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 Immunol , 2005 , 19 : 293 - 306 .
- [17] Sigh J , Lindenstrøm T , Buchmann K . Expression of pro-
inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)
during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Fish
Shellfish Immunol , 2004 , 17 : 75 - 86 .
- [18] Martin F F , Masanori K . Comparative genomics of the MHC
glimpses into the evolution of the adaptive immune system [J].
Immunity , 2001 , 15 : 351 - 362 .
- [19] Tomokazu T , Akiko I , Ikuo H , *et al.* . Development of a DNA
vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression
of immune-related genes after vaccination [J]. Fish Shellfish
Immunol , 2004 , 17 : 367 - 374 .
- [20] Hordvik I . Identification of a novel immunoglobulin δ transcript
and comparative analysis of the genes encoding IgD in Atlantic
salmon and Atlantic halibut [J]. Mol Immunol , 2002 , 39 : 85 -
91 .
- [21] Cuesta A , Meseguer J , Esteban M A . Total serum
immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in
seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. Vet Immunol Immunopathol ,
2004 , 101 : 203 - 210 .

欢迎订阅 2007 年《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊 , 主要报道水产生物学基础研究、水产生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及渔船、渔业机械与仪器等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。主要服务对象是科研、教学、科技管理人员以及大专院校师生。是反映水产科研创新成果的窗口和培养人才的园地。它面向水产业 , 为水产业的持续发展和水产经济建设服务。

本刊为双月刊 , A4 开本 , 每期 140 页 , 单月出版 , 国内外公开发行。国内定价 20 元/期 , 全年 120 元 (含邮费) 。邮发代号 : 18 - 250 , 国内统一刊号 : CN 11 - 3446/S , 国际标准刊号 : ISSN 1005 - 8737 , 国外代号 4639Q。全国各地邮电局 (所) 办理订阅手续 (可破季订阅) 。漏订或补订当年和过期刊 , 请直接向编辑部订阅。另备有少量合订本 , 欢迎购买。

《中国水产科学》1994 - 2003 年光盘 (ISBN 7 - 89995 - 232 - 8/S·004) 已经出版发行 , 每套定价 150 元。需要购买光盘的读者 , 请将款通过邮局直接寄到编辑部 , 款到寄盘 , 同时开正式报销发票。欢迎广大读者与编辑部直接联系购买事宜。

编辑部地址 : 北京市丰台区青塔村 150 号 , 邮政编码 : 100039 , 联系电话 : 010 - 68673921 , 传真 : 010 - 68673931 , E-mail : jfishok@publica.bj.cninfo.net