

## 两种细菌粗多糖对草鱼的免疫调节作用

康洁<sup>1</sup>, 余慧琳<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>商丘师范学院生命科学系, 河南商丘 476000; <sup>2</sup>商丘职业技术学院, 河南商丘 476000)

**摘要:**检测细菌多糖对草鱼的免疫调节作用。用酚水法分别从大肠杆菌和根癌农杆菌细胞壁中提取出粗多糖, 注射草鱼, 测定受试草鱼血液中白细胞数量, 血清中抗体效价, 肝脏、肾脏、脾脏、血清和粘液中过氧化物酶的活力。结果受试草鱼中的白细胞数量、血清抗体效价及过氧化物酶活力均具有明显提高。结论表明大肠杆菌和根癌农杆菌粗多糖对草鱼有免疫促进作用。

**关键词:**细菌多糖; 白细胞; 抗体效价; 过氧化物酶活性; 免疫活力

中图分类号: S942.3

文献标识码: A

论文编号: 2009-0984

### Two Types of Bacteria-polysaccharide on the Immune Regulation of Grass Carp

Kang Jie<sup>1</sup>, Yu Huilin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu He'nan 476000;

<sup>2</sup>Shangqiu Vocational and Technical College, Shangqiu He'nan 476000)

**Abstract:** The purpose of detection of bacterial-polysaccharide on the immune regulation on grass carp. We can use phenol water method to get polysaccharides from *E. coli* and *Agrobacterium tumefaciens* cell wall Injection of grass carp determination the number of leukocyte of blood, the vitality of peroxidase in Liver, kidney, spleen, serum and mucus The results of subjects are the number of grass carp in the leukocyte, serum antibody titer and peroxidase activity have markedly improved Conclusion is *E.coli* and *Agrobacterium tumefaciens* coarse polysaccharide have strong immune on grass carp.

**Key words:** bacterial polysaccharide, interleukin, antibody titer, peroxidase activity, Immunity

### 0 引言

据文献报道, 生物活性多糖对水产动物有免疫调节作用<sup>[1-2]</sup>, 淡水鱼致病细菌细胞壁多糖也能够提高水产动物的免疫水平<sup>[3-5]</sup>, 而对淡水鱼致病菌以外的其他细菌多糖的研究在国内却很少见。2002年厦门大学生命科学院从海洋土壤中筛选出一株细菌并提取其细胞壁多糖, 证明该细菌多糖对水产动物有免疫调节作用。细菌生长周期短、培养成本低, 如果采用细菌多糖作为淡水养殖鱼的免疫增强剂添加到饲料里, 对提高养殖鱼自身的免疫力, 减少用药, 提高养殖户的经济效益和保护池塘水环境平衡都有着重要的意义。

淡水养殖鱼尤其是草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的免疫能力较弱, 经常发生感染, 笔者用草鱼为受试鱼, 用大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)和根癌农杆

菌(*Agrobacterium tumefaciens*, *A.tume*)为试验菌, 采用热酚法提取两种菌的细胞壁多糖(Extracellular polysaccharide, EPS), 注射草鱼, 通过检测受试鱼的血清抗体效价、白细胞数量变化和过氧化物酶活性大小, 探讨细菌多糖对淡水养殖鱼的免疫调节作用, 为寻找新型鱼饲料添加剂提供参考。

### 1 试验材料

当地池塘养殖的草鱼(每尾300g左右), 大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 根癌农杆菌GV3101均由商丘师范学院生命科学系微生物实验室赠与。

蛋白胨, 牛肉膏, 酵母膏, 琼脂, 盐酸利多卡因, 肝素钠, 三氯乙酸(TCA), 愈创木酚等。OLYMPUS 摄像显微镜, OLYMPUS CH20 普通生物显微镜, 血球计数器, 超声波细胞粉碎机, Proline pipette, 冷冻离心机,

**基金项目:**河南省教育厅基础研究项目“细菌脂多糖、肽聚糖对鱼类免疫调节作用的研究”(2007180038)。

**第一作者简介:**康洁, 女, 1967出生, 河南民权人, 副教授, 学士学位, 主要从事细胞生物学的教学与研究, 发表学术论文20多篇。通信地址: 476000 河南商丘市文化路298号, 商丘师范学院生命科学系(文化路校区), Tel: 0370-2592849, E-mail: xkangjie@163.com。

**收稿日期:**2009-05-08, **修回日期:**2009-06-04。

Milipore超纯水系统,723可见光分光光度计等。

## 2 试验方法

### 2.1 菌液的制备

对大肠杆菌DH5 $\alpha$ 与根癌农杆菌GV3101的菌株进行活化、筛选和扩大培养<sup>[6]</sup>,分别收集细菌悬液。细菌悬液经5 000 r/min离心10 min,沉淀用0.85% NaCl、5 000 r/min离心洗涤10 min,如此两次,收集沉淀。分别将沉淀物(菌体)稀释为2000亿个/ml,取10 ml于小烧杯中,4℃过夜。

### 2.2 改良酚水法提取粗多糖

对热酚水法<sup>[7]</sup>稍加改进,分别将90%苯酚溶液,10 ml细菌悬液于66℃水浴锅中预热10 min;边搅拌细菌悬液边逐滴滴加等体积经预热的苯酚溶液,66℃水浴搅拌25 min,室温冷却,4℃冰箱过夜;5 000 r/min离心15 min,将上层清液吸到另一试管中,剩下的酚层及残渣组分再加10 ml水,66℃水浴搅拌30 min,冷却,离心,取上清液;将两次提取的水溶液混合,于0.85%生理盐水中透析48 h;将透析后的粗多糖溶液分装于10 ml离心管中,4℃冰箱储存。

### 2.3 细菌粗多糖对草鱼白细胞数量的影响

#### 2.3.1 不同浓度粗多糖对草鱼白细胞数量的影响

##### (1)处理受试鱼

将从市场上购得的草鱼于同一水池中饥饿处理一周。随机挑选24尾大小相当、生命力旺盛的草鱼,分成8组,编号1~8(1号设为对照),将大肠杆菌粗多糖按照如下梯度0、1、2、5、10、20、40、100稀释成7个梯度(0为空白对照组),分别于受试鱼胸鳍基部进行EPS溶液的注射,注射时间、剂量和位置见表1。

表1 EPS注射的时间、剂量和位置

时间/h	剂量/ml	位置
0	0.1	左侧
48	0.2	右侧
96	0.2	左侧
144	0.2	右侧
192		尾部采血

##### (2)制备血细胞

参考文献[8],取500  $\mu$ l血液,加入0.85% NaCl溶液混合均匀,4℃5 000 r/min离心10 min,弃上清,两次后加入500  $\mu$ l Hank's II(不含酚红)混合均匀,将此血细胞溶液作为2倍稀释。

##### (3)白细胞的观察

参考文献[9-10],取5  $\mu$ l、2倍血细胞稀释液,用0.85%NaCl溶液制成100倍血细胞稀释液。吸取5  $\mu$ l

稀释液,加5  $\mu$ l 0.85% NaCl和10  $\mu$ l改良染液(改良配方:100  $\mu$ l 1%酚红,100  $\mu$ l 1%甲基绿,100  $\mu$ l 95%酒精,1 700  $\mu$ l蒸馏水混合均匀,避光保存配方)混合,染色2 min。40X光学显微镜下用血球计数器对血液白细胞统计计数,并在OLYMPUS摄像显微镜拍照。

#### 2.3.2 两种细菌来源的粗多糖对草鱼白细胞数量的影响

饥饿处理受试鱼1周,随机选取生命力旺盛、大小相当的草鱼9尾,分成3组,编号1~3,分别注入经0.85%生理盐水稀释10X的*E.coli*和*A.tume*的EPS,0.85%生理盐水做对照。注射时间、部位和剂量同表1。

血细胞制备、白细胞观察的方法同2.3.1。

### 2.4 两种细菌粗多糖对草鱼血清抗体效价的影响

#### 2.4.1 处理受试鱼 方法同2.3.2

2.4.2 制备抗血清 麻醉受试鱼<sup>[11]</sup>,将盐酸利多卡因注射液用池塘水稀释40倍,然后将受试鱼分批放入麻醉稀释液约3 min。采集血液,分离血清<sup>[12-13]</sup>。

2.4.3 血清抗体效价检测 用20% TCA浸洗96孔板,蒸馏水清洗、酒精浸洗、无菌水冲洗,于37℃无菌恒温培养箱恒温干燥。吸取0.1 ml血清加入96孔板每行的第1孔内,在该行的其他孔内加入0.05 ml无菌PBS(pH 7.2),第1孔内取0.05 ml血清加入同行第2孔内,混匀后再从第2孔内取0.05 ml液体加入同行后一孔内,如此重复,做2倍序列稀释。每一血清样本做A、B两组,在A组中每个孔内加入0.05 ml活的*E.coli*,B组中每个孔内加入0.05 ml活的*A.tume*,37℃孵育过夜;24 h后取出96孔板于黑色背景下观察。

### 2.5 受试鱼不同组织过氧化物酶活力测定

2.5.1 解剖取内脏 将解剖摘取经*E.coli*注射的鱼的肝脏、肾脏、脾脏分别置于Hank's溶液中洗净血迹,并保存于Hank's溶液中,于4℃冰箱保存备用。

2.5.2 制备过氧化物酶粗提液 将保存于Hank's溶液中的内脏取出,0.85%生理盐水浸洗3次,吸水纸吸干水分,然后置于精密天平上称重,记录数据;然后转移至研4℃冰箱中预冷钵中,加入4倍于其重量的缓冲液,破碎组织制成悬液,使加入的缓冲液最终质量为肝脏9倍、肾脏19倍、脾脏39倍,然后冰浴条件下超声波破碎约25s,取5000  $\mu$ l转移至10ml离心管中,4℃、5000 r/min离心20 min,收集过氧化物酶(peroxidase, POD)粗提液,并将其转移至经高温灭菌的离心管中,置于4℃冰箱中待测。

2.5.3 酶活力测定 参考文献[14],将0.05 mol/l的磷酸钾缓冲液(pH 6.0)、0.05 mol/l愈创木酚,过氧化物酶粗提液分别在37℃温浴5 min。取12只干净的试管,

分成4组,编号1~4,分别于每只试管中加入2.9ml、0.05mol/l的磷酸钾缓冲液(pH 6.0)与1.0 ml、0.05 mol/l愈创木酚,1~3组试管中再加入取自各试验组所对应的内脏POD粗提液0.1 ml,4组试管作为空白对照组,然后混合均匀,置于37℃水浴锅中;于每只试管中加入1 ml 2.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>并将之混合均匀。15 min后每只试管加入2 ml、20%TCA终止反应,冰浴5 min,随即测定各管吸光值。

### 3 结果与分析

#### 3.1 不同浓度细菌粗多糖对草鱼白细胞数量的影响

用不同浓度大肠杆菌粗多糖注射草鱼,对其血液

中白细胞数量的影响非常显著。随着EPS浓度的降低,受试鱼血液中白细胞比例呈现明显的下降趋势,表明不同浓度EPS对受试鱼免疫力的影响存在显著差异。如2X、10X、40X、100X稀释EPS所对应血液中白细胞的比例分别为:12.38%、10.89%、9.02%、7.81%,和对照组(6.88%)相比,白细胞的比例分别提高了79.94%、58.28%、31.10%、13.52%(如图1)。

#### 3.2 两种细菌来源的粗多糖对草鱼白细胞数量的影响

来源不同的EPS引起血液中白细胞数量的变化并不相同,来自*E.coli*的EPS使白细胞增加到11.07%,

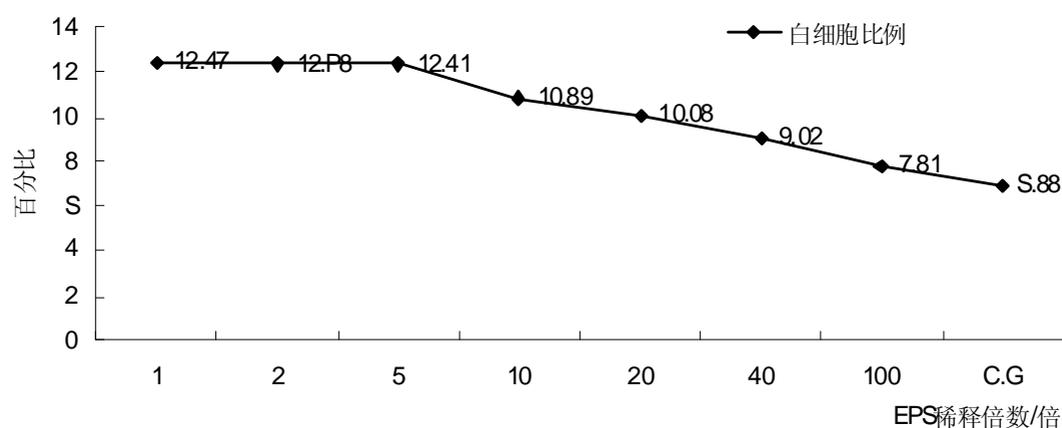
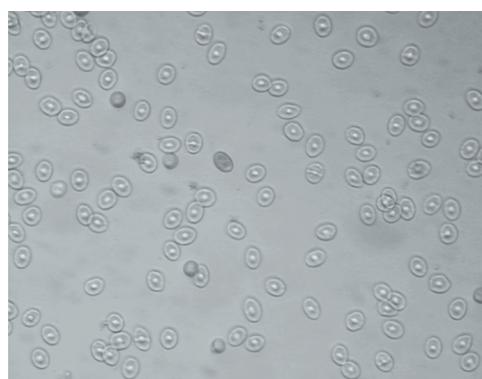


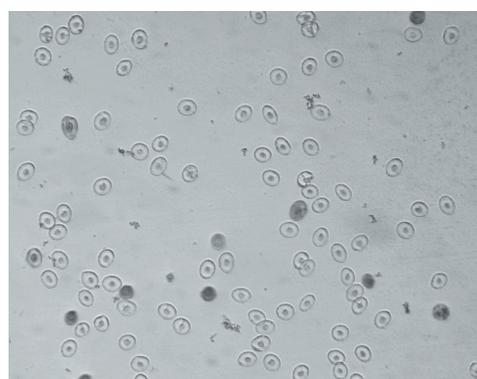
图1 大肠杆菌EPS浓度对草鱼白细胞数量的影响(C.G.:对照组)

而来自*A.tume*的EPS所对应的白细胞比例为10.21%,与对照组(7.69%)相比,二者增加的比例分别为:52.15%、32.77%。表明这两种EPS对受免鲫鱼免疫增

强作用存在显著差异,来自*E.coli*的EPS增强作用更明显。OLYMPUS摄像显微镜下观察染色后的白细胞结果与上述一致,如图2。



a



b

图2 40X显微照片显示染色后的白细胞分布

注:a:*E.coli*的EPS;b:*A.tume*的EPS。

#### 3.3 受试鱼血清抗体效价检测结果

用*E.coli*作为抗原,受试鱼血清凝集敏感性顺序为EPS.E.>EPS.A>EPS.C(EPS.E.:EPS of *E.coli*、EPS.A.:EPS of *A.tume*、EPS.C.:the control group);表明*E.coli*粗多糖和*A.tume*粗多糖均能够增加受试鱼血清对*E.coli*凝集的敏感性,*E.coli*粗多糖比*A.tume*粗多糖更显著;用*A.*

*tume*作为抗原,受试鱼血清凝集敏感性顺序为EPS.A.>EPS.E.>EPS.C,*E.coli*粗多糖和*A.tume*粗多糖均能够增加受试鱼血清对*A.tume*凝集的敏感性,*A.tume*粗多糖比*E.coli*粗多糖更显著;经EPS免疫的受试鱼血清抗体凝集反应较生理盐水组更敏感,血清效价顺序为:EPS.E.*E.coli*>EPS.A. *A.tume*>EPS.E. *A.tume*=EPS.A. *E.coli*>

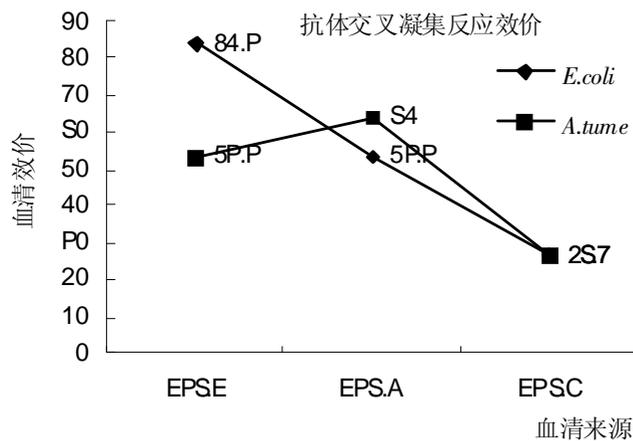


图3 受试鱼血清抗体交叉凝集反应效价测量结果

注:*E.coli*, *A.tume*:病原菌; EPS.E, EPS.A, EPS.C 表示对草鱼处理方式

EPS.C. *E.coli*= EPS.C. *A.tume*; 表明这两种 EPS 存在一定程度上的共同免疫源性(如图3)。

### 3.4 不同细菌来源 EPS 对受试鱼各组织中过氧化物酶活力的影响

不同来源的 EPS 对不同组织或器官过氧化物酶活力(Peroxidase activity, PA)的影响并不一致,对血清、肾脏和脾脏来说,POD 作用于底物后所测得的 OD 值由高到低的顺序为: E.>A.>S.(E.: EPS 来源于 *E.coli*; A.: EPS 来源于 *A.tume*; S.: 生理盐水)。和对照组相比,两种细菌来源的 EPS 均能够引起这 3 种器官中 PA 的水平增加了。肝脏中 OD 的顺序为 S.>E.>A., PA 的水平略微下降。粘液中中和对照组几乎无差异,如图4。

## 4 讨论

细菌细胞壁多糖主要是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和肽聚糖(peptidoglycan, PG)脂多糖是主要存在于革兰氏阴性细菌(G-)中,结构较复杂,是热稳定的,易从细胞壁抽提、纯化。LPS 分子由 O-侧链、核心寡糖和脂质 A 组成三部分组成: O-侧链是由 2~4 个糖基组成寡糖的重复结构的长链,其糖基组成和结构,不但在不同菌种之间,而且在同一菌种内部不同类群之间,都有所差别,是细菌抗原的决定因子,也是细菌免疫特异性的基础<sup>[15]</sup>。肽聚糖主要存在于革兰氏阳性细菌(G+)中,PG 结构相对简单,是由双糖单位、四肽尾和肽桥聚合而成得多层网状大分子结构。近年来有学者用 PG 对淡水鱼进行免疫学研究,发现肽聚糖能够提高淡水鱼类的免疫力<sup>[16-17]</sup>。

试验采取热酚法提取 *E.coli* 和 *A.tume* 细胞外多糖(EPS),并对常用的热酚法进行了改进。*E.coli* 和 *A.tume* 是革兰氏阴性菌,提取成分里主要是脂多糖(LPS)。利用提取的两种 EPS 对草鱼进行免疫研究,结果表明:来源不同的 EPS 均能够引起受试鱼血液中

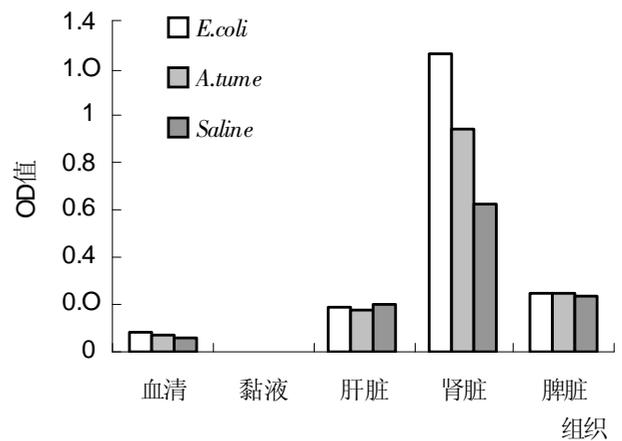


图4 不同来源 EPS 引起受试鱼各组织 PA 变化的测量结果

的白细胞的数量的显著增加。血液中红、白细胞的比例反映机体的免疫水平<sup>[18]</sup>,机体免疫水平增加时,血液中白细胞的水平也相应提高。注射 *E.coli* 和 *A.tume* EPS 后使受试鱼的白细胞数量得到提高,不同浓度的 EPS 也使受试鱼白细胞数量显示出明显差异,因此说 *E.coli* 和 *A.tume* EPS 对淡水鱼有免疫促进作用。

利用交叉凝集反应测试受试鱼血清抗体效价的试验结果表明,受试鱼经过 *E.coli* 和 *A.tume* EPS 注射后,其血清对同种病原菌的敏感性要高于其它细菌,说明此受试鱼血清中抗体对抗原凝集敏感性高,抗体效价高, EPS 使受试鱼免疫活力增加显著。

PA 值能反映草鱼的免疫水平,试验发现经过 EPS 注射后,受试鱼不同部位的免疫水平存在着差异,血清、肾脏、脾脏 POD 均增加了,表明 EPS 能够调节这些组织的免疫水平。试验中发现受试鱼肝脏中的 POD 比对照组中的略低,造成这种结果的原因可能是肝脏作为解毒器官对 EPS 的敏感性更高。

试验中采用超声波破碎技术提取 POD 的方法在同类试验中很少应用,超声波破碎优点是能够迅速而精确的得到组织液,但同时也存在使酶蛋白失活的风险<sup>[19-20]</sup>。以受试鱼肝脏为原料研究发现,酶蛋白的活力大小与破碎时间关系紧密,破碎时间在 30~60 s 之间时 PA 的活力值不会发生明显变化,超过 60 s 后,酶活力将会显著降低。所以试验选用了最短而破碎效果又较理想的 25 s 作为所有受试鱼提取组织 POD 的最佳时间。

在淡水鱼养殖中,常见的病害包括细菌性烂鳃病、细菌性肠炎、病出血性腐败等,这些病害多是由致病细菌引起的。常规的防治方法是利用漂白粉挂篓或漂白粉全池泼洒消毒,或是在发生病害时使用磺胺胍、磺胺噻唑等化学药物,虽然这也能控制病情,但是长期

利用化学药物进行淡水鱼病害的防治,会增加致病菌耐药性。一旦抗药性病原菌扩散,势必导致病害大面积发生,这将严重损害水产养殖户的利益,也容易破坏水环境的生态平衡。试验结果表明细菌EPS能够显著增强受试鱼自身的免疫水平,如果在鱼饲料中添加细菌ESP或LPS来增强鱼自身免疫力,对抵抗疾病、保护水生态环境,减少草鱼病害带来的经济损失有着积极的意义。

### 参考文献

- [1] 孙翠慈,王安利,王索芬,等.活性多糖对水产动物免疫功能的调节[J].海洋通报,2003,22(3):40-48.
- [2] 殷红,葛长荣,程志斌,等.生物活性多糖在水产养殖业中的应用前景[J].兽医与饲料添加剂,2004(2):18-23.
- [3] 陈昌福,曾妍熊,楠田理一.接种不同种类病原菌脂多糖对翘嘴鳊细菌性败血症的免疫保护力比较[J].华中农业大学学报,2000,19(4):377-380
- [4] 周永灿,张奉,陈雪芬,等.嗜麦芽假单胞菌脂多糖的制备及其在卵形鲳参中的免疫反应[J].水产学报,2002,26(2):143-148.
- [5] MacArthur JI, Thomson AW, Fletcher TC. As-PECTS OF Leucocyte migration in the plaice, *Pleurondos platessal* [J]. Fish Bid, 1985, (27): 667-676.
- [6] 黄秀梨.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社(CHEP),施普林格出版社(Springer),1999.56-58
- [7] 宋宏新,刘晓阳,李宏.改良热酚水法制备大肠杆菌O157:H7脂多糖抗原的研究[J].工艺技术,2006,27(10):273-275
- [8] 黄诗笺,刘思阳,卢欣副.动物生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社(CHEP),施普林格出版社(Springer),1999.23-31
- [9] 叶海斌,朱安成,张涛,等.溶藻胶弧菌之多糖对大菱鲆白细胞吞噬活性的影响[J].齐鲁渔业,2006,23(3):34-35.
- [10] 刘巧,王跃群,刘少军,等.不同倍性鲫鲤鱼血液及血细胞的比较[J].自然科学进展,2004,4(10):1111-1116.
- [11] 安丽娜,董在杰.鱼类麻醉及其方法[J].科学养鱼,2008,6(2):52-54.
- [12] 陈昌福,邓健平,楠田理一.不同方法提取的嗜水气单胞菌脂多糖对鳊免疫活性的比较[D].华中农业大学学报,1999,18(5):469-471.
- [13] 曹振杰,曲世科,丛日祥,等.免疫多糖对草鱼免疫功能的影响[J].齐鲁渔业,1999,16(3):43-44.
- [14] Caballero A, Toro M A. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations[J]. Conservation Genetics. 2002, (3): 289-299.
- [15] Nishiuchi Y, Doe M, Hotta H, et al. Structure and serologic properties of O-specific polysaccharide from *Citrobacter freundii* possessing cross-reactivity with *Escherichia coli* O157:H7[J]. Immunology and Medical Microbiology, 2000, 28: 163-171.
- [16] 张璐一,艾庆辉,麦康森,等.肽聚糖对鲈鱼生长和非特异性免疫力的影响[J].中国海洋大学学报,2008,38(4):551-556.
- [17] 刘景圣,蔡丹,孙涛.嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离提取[J].吉林农业大学学报,2008,30(4):605-609.
- [18] KOLLNER B, KOTTERBA G. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12: 35-48.
- [19] 马永征,宋宏新,李敏康.氯化血红素提取中超声波细胞破碎条件的研究[J].陕西科技大学学报,2005,23(2):41-44.
- [20] 罗昭锋,瞿鑫,沐万孟,等.超声和高压处理对牛血清白蛋白结构的影响[J].中国生物工程杂志,2006,26(1):46-49.