

玉米蛋白粉替代鱼粉对暗纹东方鲀溶菌酶活性及 c型溶菌酶 mRNA 表达的影响

钟国防, 钱曦, 华雪铭, 周洪琪*

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点开放实验室, 上海 201306)

摘要:以初重为(41.26 ± 1.09) g的暗纹东方鲀为实验鱼, 配制5种玉米蛋白粉使用量为0%、5%、10%、15%、20%的实验饲料, 玉米蛋白粉对饲料中鱼粉的替代水平分别为0%、7.4%、14.8%、22.2%和29.6%。用实验饲料饲养暗纹东方鲀60 d, 研究玉米蛋白粉替代鱼粉对暗纹东方鲀肝胰脏、头肾和脾脏组织的溶菌酶活性及其c-型溶菌酶 mRNA 相对表达量的影响。结果表明, (1) 暗纹东方鲀肝胰脏、头肾和脾脏的溶菌酶比活力分别为9.14、42.12和40.49 U/mg prot, 头肾和脾脏组织中c-型溶菌酶 mRNA 相对表达量分别是肝胰脏的3.76和3.24倍。(2) 玉米蛋白粉替代鱼粉显著影响暗纹东方鲀溶菌酶比活力。5%和10%组的肝胰脏和头肾组织溶菌酶比活力显著高于对照组($P < 0.05$), 而15%和20%组肝胰脏和头肾组织溶菌酶比活力则显著低于对照组($P < 0.05$); 5%和10%组的脾脏组织溶菌酶活力与对照组无显著性差异($P > 0.05$), 而15%和20%组显著低于对照组和5%组($P < 0.05$)。(3) 玉米蛋白粉对暗纹东方鲀c型溶菌酶基因 mRNA 相对表达量有显著影响($P < 0.05$)。肝胰脏组织中5%和10%组表达量显著高于对照组, 而15%和20%组则显著低于对照; 头肾组织中5%组与对照组无显著性差异, 10%组显著高于对照组, 而15%和20%组则显著低于对照组。脾脏组织中5%、10%组表达量与对照组无显著性差异, 而15%和20%组则显著低于对照组。综上所述, 适量使用玉米蛋白粉能提高暗纹东方鲀溶菌酶比活力及其c-型溶菌酶基因 mRNA 相对表达量, 两者都在玉米蛋白粉使用量为10%时达到峰值。

关键词:暗纹东方鲀; 玉米蛋白粉; 溶菌酶活性; 溶菌酶基因 mRNA 表达

中图分类号: S 963

文献标识码: A

蛋白质是鱼类饲料中重要的营养物质, 全球鱼类资源短缺, 资源保护与鱼粉市场需求矛盾造成鱼粉的价格居高不下, 从而促进了动植物饲料蛋白源的开发和利用。近年来, 植物蛋白源替代鱼粉的研究不断深入, 已从最初研究植物蛋白替代鱼粉对水产动物生长性能的影响, 逐步涉及营养与生理^[1-2]、营养与免疫^[3]等研究。研究表明, 豆粕^[4]、发酵豆粕^[5]、棉粕^[2]及植物蛋白酶解物^[6]等替代鱼粉能够影响鱼类的溶菌酶、超氧化物歧化酶的活性等。溶菌酶广泛存在于各种植物、无脊椎动物和高等动物, 能催化细菌细胞壁中

肽聚糖 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4 糖苷键的水解, 破坏肽聚糖支架, 导致细菌细胞壁破裂、内含物逸出而使细菌溶解死亡, 是一种广谱抗菌效应分子。鱼类溶菌酶活性是反映鱼类免疫能力的重要指标, 至今, 有关玉米蛋白替代鱼粉对水产动物溶菌酶活性的影响及其调控机制尚未见报道。

本试验以暗纹东方鲀 (*Fugu obscurus*) 为试验材料, 研究玉米蛋白粉替代鱼粉对暗纹东方鲀溶菌酶活性及其 c-型溶菌酶 mRNA 表达的影响, 探讨饲料蛋白源对暗纹东方鲀溶菌酶活性的调控

收稿日期:2009-11-16 修回日期:2010-05-12

资助项目:上海市科委重大科技攻关项目(06DZ19102, 073205111); 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室开放课题(KFT2008-2)

通讯作者:周洪琪, Tel:021-61900416, E-mail:hqzhou@shou.edu.cn

机制,为玉米蛋白粉在暗纹东方鲀饲料的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼的饲养

暗纹东方鲀购于上海水产研究所水产试验良种场,玉米蛋白粉由常州亚源生化科技有限公司提供。鱼饲养于上海海洋大学水产动物营养与饲料实验室的室内循环水族箱(0.7 m × 0.6 m × 0.5 m)内,随机将鱼分成5组,每组设3个重复,每个重复11尾鱼。先用商品饲料驯养2周后开始饲养试验,鱼的初始体重为(41.26 ± 1.09) g,

体长为(12.94 ± 0.22) cm。

以鱼粉为主要蛋白源、辅以少量豆粕和鸡肉粉配制不含玉米蛋白粉的基础饲料为对照,试验饲料的玉米蛋白粉用量为0%、5%、10%、15%和20%(表1),替代鱼粉的水平分别为0%、7.4%、14.8%、22.2%和29.6%,共饲养暗纹东方鲀60 d。采用饱食法进行投饵,以1 h内不再摄食为准,每天投饵两次(8:30、16:00)。投食后1 h用小捞网捞取残饵,记录残饵量。实验期间,每个水族箱加水容量为190 L,温度为(25 ± 1) °C,24 h连续充气,每天吸污一次、换水三分之一,DO > 7 mg/L, NH₄⁺-N < 0.5 mg/L。

表1 实验饲料的组成和营养成分

Tab. 1 Formulation and proximate chemical composition of the tested diets

饲料组成 composition	0%组	5%组	10%组	15%组	20%组
进口红鱼粉 fish meal	54.00	50.00	46.00	42.00	38.00
淀粉 a-starch	22.00	22.00	22.00	21.20	20.06
玉米蛋白 corn gluten meal	0.00	5.00	10.00	15.00	20.00
鸡肉粉 chicken meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
豆粕(浸提) soybean meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
复合添加剂 mixture additive	2.22	2.22	2.22	2.22	2.22
鱼油 fish oil	2.50	2.70	2.90	3.08	3.22
面粉 wheat power	2.78	1.58	0.38	0.00	0.00
营养成分 proximate composition(% in wet weight)					
粗蛋白 crude protein	45.52	45.40	45.38	45.43	45.64
粗脂肪 crude fat	7.54	7.51	7.56	7.60	7.63
水分 moisture	7.35	7.15	7.08	7.02	6.92
灰分 ash	13.51	13.12	13.01	12.95	12.90
能量(kJ/g) energy	22.06	22.03	22.09	22.15	22.21

1.2 取样

实验开始前,随机取15尾鱼的头肾、脾脏和肝胰脏组织置于液氮速冻后,转移至-70 °C保存,供总RNA抽提,另取9尾鱼的头肾、脾脏和肝胰脏组织保存于-20 °C用于溶菌酶活性测定。饲养实验结束,每个水族箱随机取8尾鱼,每组24尾鱼用MS-222(100 mg/L)麻醉后取样,其中15尾鱼的头肾、脾脏和肝胰脏组织置于液氮速冻后转移至-70 °C保存,供总RNA抽提,另外9尾鱼的头肾、脾脏和肝胰脏组织保存于-20 °C,用于测定溶菌酶活性。

1.3 溶菌酶活性和蛋白含量的测定

以每尾鱼的头肾、脾脏和肝胰脏组织作为一个样本。每个样本称重1 g左右,按1:9加入高纯水

制成10%的匀浆液,4 000 r/min离心15 min,取上清液作为粗酶液,4 °C保存,按Subbotkina等^[7]方法测定溶菌酶活性,在24 h内测定完毕。蛋白含量采用考马斯亮蓝法,按说明书进行^[8]。

1.4 c型溶菌酶基因mRNA表达测定

RNA提取 分别取暗纹东方鲀头肾、脾脏和肝胰脏50~100 mg,根据Trizol Reagent说明书抽提总RNA。使用紫外分光光度计测定RNA溶度,OD_{260 nm}/OD_{280 nm}值为1.9~2.0。

引物合成 根据本实验室已经获得的暗纹东方鲀c型溶菌酶全长序列设计引物P1、P2。根据GeneBank中报道的鱼类β-actin保守序列设计暗纹东方鲀β-actin引物P3、P4,所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成(表2)。

表 2 暗纹东方鲀 c 型溶菌酶目的基因与 β -actin 内标基因引物序列参数Tab. 2 Parameters of primer pairs for c-lysozyme and β -actin gene from obscure puffer (*Fugu obscurus*)

引物 primers	序列 sequence	产物(bp) length of fragment
c-溶菌酶	P1 5'- ACCACAACACCGATGGTTCACCG-3'	240
c-LSZ	P2 5'-AGGAGAACTCAACTGGCGCCAGCA -3'	
β -actin	P3 5'-CAC TGT GCC CAT CTA CGA G-3'	226
	P4 5'-CCA TCT CCT GCT CGA AGT C-3'	

荧光定量 RT-PCR 按照 SYBR[®] Prime Script[™] RT-PCR Kit 说明书,先进行 RT 反应,反转引物为 oligo dT。反应条件为 42 °C、15 min(反转录反应),95 °C、2 min(反转录酶的失活反应)。PCR 反应条件为 95 °C 15 s,60 °C 退火延伸 1 min,共 40 个循环;60 °C 溶解曲线检测。内参基因采用 β -actin,反应在 Bio-Rad iQ5 定量 PCR 仪上进行。每个样品设 3 个重复。同一样品的内参和目的基因在同一个 96 孔板中分两管同时扩增,同时扩增标准品(内参 β -actin 和目的基因溶菌酶基因),每次 PCR 均制备溶菌酶和 β -actin 相对标准曲线,以排除每次 PCR 扩增效率不一致的干扰。

标准品的制备 取一管浓度较高的 RNA 样品,用 Easy Dilution Buffer 将其倍比稀释(1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵),用于构建溶菌酶和 β -actin 相对标准曲线。

溶菌酶 mRNA 的表达 采用双标准曲线法^[9-11]计算荧光定量结果,目的基因和内参在标准曲线上有相对应值,它们之间的比值被认为是溶菌酶 mRNA 的相对表达量。最后,将各试验组

特定组织的溶菌酶 mRNA 的相对表达量与其在对照组的相对表达量进行比较。

1.5 数据分析

试验结果用平均值 \pm 标准差($x \pm SD$)表示。所有数据用 SPSS 11.5 软件进行方差分析(One-way-ANOVA),采用 Duncan's procedure 比较组间差异, $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 暗纹东方鲀肝胰脏、脾脏和头肾的溶菌酶活性以及 c-型溶菌酶 mRNA 表达

实验开始,暗纹东方鲀肝胰脏、头肾和脾脏组织的溶菌酶比活力分别为 9.14、42.12 和 40.49 U/mg prot,头肾和脾脏的溶菌酶比活力显著高于肝胰脏($P < 0.05$)(图 1-a)。

3 种组织的 c-型溶菌酶 mRNA 表达量也有显著差异($P < 0.05$)。以肝胰脏的 c-型溶菌酶 mRNA 表达量为 1,头肾和脾脏的 c 型溶菌酶 mRNA 相对表达量分别为 3.76、3.24(图 1-b),头肾和脾脏两种组织之间则无显著差异。

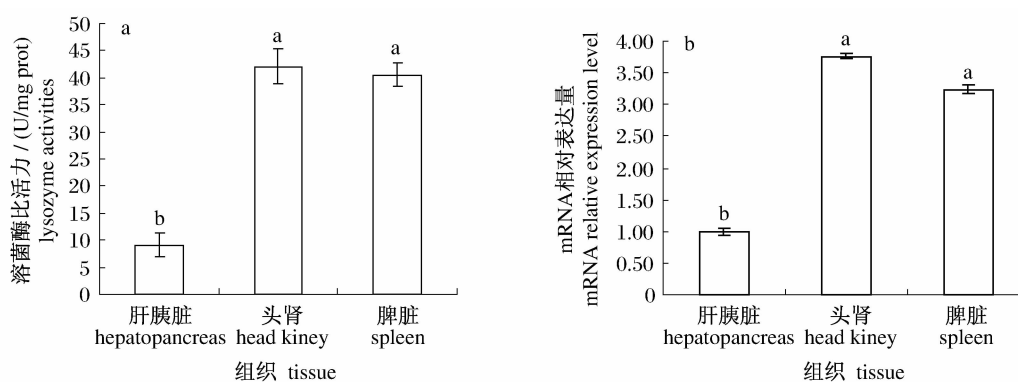


图 1 暗纹东方鲀肝胰脏、头肾、脾脏的溶菌酶比活力 (a) 以及 c-型溶菌酶 mRNA 相对表达 (b)

图中不同的上标字母表示差异性显著($P < 0.05$)。

Fig. 1 Lysozyme activities (a) and mRNA expression levels (b) in hepatopancreas, head kidney, and spleen of *Fugu obscurus*

The different superscript letters indicate difference at $P < 0.05$.

2.2 玉米蛋白粉替代鱼粉对暗纹东方鲀溶菌酶比活力的影响

饲养 60 d, 暗纹东方鲀生长正常。对照组肝胰脏、头肾和脾脏的溶菌酶比活力分别为 9.54 U/mg prot、44.12 U/mg prot 和 44.49 U/mg prot, 与实验开始时三种组织的比活力相似, 肝胰脏的比活力最低, 头肾和脾脏组织中活力较高。

玉米蛋白粉替代鱼粉对暗纹东方鲀肝胰脏、头肾、脾脏溶菌酶比活力影响显著(表 3)。5% 和 10% 玉米蛋白粉组的肝胰脏溶菌酶比活力分别比对照组提高了 31.45% 和 34.91% ($P < 0.05$), 但是, 15% 和 20% 玉米蛋白粉组的肝胰脏溶菌酶比

活力分别比对照组下降了 25.89% 和 59.54%, 显著低于对照组、5% 组和 10% 组 ($P < 0.05$)。10% 玉米蛋白粉组头肾溶菌酶活力比对照组提高了 39.14% ($P < 0.05$), 5% 玉米蛋白粉组头肾溶菌酶活力与对照组没有显著性差异, 而 15% 和 20% 组分别比对照组下降 33.36% 和 29.35% ($P < 0.05$)。5% 和 10% 玉米蛋白粉组的脾脏溶菌酶活力与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 15% 和 20% 组的脾脏溶菌酶活力分别比对照组下降了 47.88% 和 44.08%, 显著低于对照组、5% 组和 10% 组 ($P < 0.05$)。

表 3 玉米蛋白粉对暗纹东方鲀肝胰脏、头肾和脾脏溶菌酶比活力的影响
Tab. 3 Lysozyme specific activities in hepatopancreas, head kidney, and spleen of *Fugu obscurus* fed with different amounts of corn gluten meal

组别 group	肝胰脏 hepatopancreas	头肾 head kidney	脾脏 spleen
对照组 control group	9.54 ± 2.58 ^b	44.12 ± 3.42 ^b	44.49 ± 2.47 ^{ab}
5% 组 5% group	12.54 ± 2.48 ^a	42.31 ± 13.14 ^{bc}	39.64 ± 5.33 ^b
10% 组 10% group	12.87 ± 0.88 ^a	61.39 ± 5.37 ^a	45.47 ± 6.42 ^a
15% 组 15% group	7.07 ± 1.16 ^c	29.40 ± 8.77 ^d	23.19 ± 5.18 ^c
20% 组 20% group	3.86 ± 1.41 ^d	31.17 ± 8.21 ^{cd}	24.88 ± 3.12 ^c

注: 同一列中不同的上标字母表示差异性显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Means in the same column with a different superscript letters indicate difference at $P < 0.05$.

2.3 玉米蛋白粉替代鱼粉对暗纹东方鲀 c 型溶菌酶 mRNA 表达的影响

玉米蛋白粉替代鱼粉对暗纹东方鲀 c 型溶菌酶 mRNA 相对表达量有显著影响(表 4)。5% 组和 10% 组的肝胰脏 c 型溶菌酶 mRNA 相对表达量分别比对照组提高了 57% 和 52% ($P < 0.05$), 而 15% 组和 20% 组则分别比对照组下降了 17% 和 48% ($P < 0.05$)。5% 组和 10% 组脾脏 c 型溶

菌酶 mRNA 相对表达量与对照组没有显著性差异, 而 15% 组和 20% 组则分别比对照组下降了 40% 和 37%, 显著低于对照组、5% 组和 10% 组 ($P < 0.05$)。10% 组头肾 c 型溶菌酶 mRNA 相对表达量显著高于对照组和其它各实验组 ($P < 0.05$), 5% 组与对照组无显著性差异, 15% 和 20% 组表达量分别比对照组下降了 14% 和 11% ($P < 0.05$)。

表 4 玉米蛋白粉对暗纹东方鲀肝胰脏、头肾和脾脏溶菌酶 mRNA 表达量的影响
Tab. 4 C-lysozyme mRNA expression in hepatopancreas, head kidney, and spleen of *Fugu obscurus* fed with different amounts of corn gluten meal

组别 group	肝胰脏 hepatopancreas	头肾 head kidney	脾脏 spleen
对照组 control group	1.00 ± 0.04 ^b	1.00 ± 0.06 ^b	1.00 ± 0.05 ^{ab}
5% 组 5% group	1.57 ± 0.07 ^a	0.96 ± 0.07 ^{bc}	0.95 ± 0.08 ^b
10% 组 10% group	1.52 ± 0.14 ^a	1.15 ± 0.04 ^a	1.01 ± 0.03 ^a
15% 组 15% group	0.83 ± 0.04 ^c	0.86 ± 0.09 ^d	0.60 ± 0.08 ^c
20% 组 20% group	0.52 ± 0.04 ^d	0.89 ± 0.08 ^{cd}	0.63 ± 0.04 ^c

注: 同一列中不同的上标字母表示差异性显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Means in the same column with a different superscript letters indicate difference at $P < 0.05$.

3 讨论

3.1 暗纹东方鲀头肾、肝胰脏和脾脏组织的溶菌酶活性及其 mRNA 表达

溶菌酶在鱼体内分布广泛, 鱼类的黏液、血清

和一些淋巴组织中都检测到了溶菌酶^[12-13], 其活性因组织差异显著。对不同组织溶菌酶活性的研究, 不同的人得到的结果不尽相同。假雄牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 黏液、血清和肾脏等免疫组织中溶菌酶的活力比胃、中肠、后肠等消化道组

织中的强^[14],而史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)和小体鲟(*Acipenser ruthenus*)的前肠、幽门垂等消化道组织溶菌酶活性比脾脏和血清等免疫组织中的高^[15]。本实验暗纹东方鲀头肾和脾脏的溶菌酶活性显著高于肝胰脏,这与 Subbotkina 等^[7]对俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedtii*)和闪光鲟(*Acipenser stellatus*)、钱曦等^[8]对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的研究结果一致。然而,鱼类脾脏的溶菌酶活性因鱼的种类而异。大西洋盲鳗(*Myxine glutinosa*)和大西洋鳕(*Gadus morhua*)的脾脏测不到溶菌酶的活性^[16],俄罗斯鲟和闪光鲟^[7]、史氏鲟^[15]、异育银鲫^[8]以及本试验暗纹东方鲀的脾脏均有溶菌酶活性。溶菌酶活性的差异可能与溶菌酶的产生机制有关。鱼体中溶菌酶的产生与哺乳类动物相似,主要由嗜中性粒细胞、单核细胞以及由单核细胞转化而成的巨噬细胞生成^[17],由于血细胞的不均衡分布使得鱼类血液、肝、脾、肾、肠黏膜等组织的溶菌酶活性各不相同^[18-20]。

鱼类的溶菌酶有 c-型溶菌酶和 g-型溶菌酶两种类型,它们的功能和表达模式因鱼的种类而异。研究认为,鱼类 c-型溶菌酶是多基因家族并且起源复杂,从而使得它具有消化、抗菌、促生长等多种功能^[21-25]。目前,c-型溶菌酶基因 mRNA 的组织差异表达研究已有报道,一般认为组织间差异表达是组织器官与功能相适应的一种表现。本研究 c-型溶菌酶 mRNA 的表达以头肾最高,其次是脾脏,肝胰脏最低,推测其功能主要与免疫相关。这与钱曦等^[8]对异育银鲫的研究相似,认为头肾和脾脏 c-型溶菌酶 mRNA 的表达量显著高于肝胰脏;也与对大西洋鲑(*Salmo salar* L.)的研究结果相类似^[26],Wang 等^[27]对凡纳滨白对虾(*Litopenaeus vannamei*)的研究也认为在肝胰脏中表达最低。这些组织间的表达差异可能与巨噬细胞的不平均分布有关,巨噬细胞通常在头肾和脾脏中分布较多,而在肝脏中分布较少^[28]。但 Rose 等^[29]对比目鱼的研究与上述结果不同,认为比目鱼 c-型溶菌酶主要在肠、肝等消化器官中表达,推测其与消化功能有关,而 g-型溶菌酶与抗菌功能相关,主要在脾脏、头肾等免疫器官中表达。

3.2 玉米蛋白粉替代鱼粉对溶菌酶活性及 c 型溶菌酶 mRNA 表达的影响

鱼类溶菌酶活性受饲料蛋白质数量和质量的

影响,菜粕、棉粕^[2]、大豆分离蛋白^[30]、发酵豆粕^[5]及酵母细胞壁^[31]等替代鱼粉均能影响鱼类溶菌酶活性。由于植物蛋白含有抗营养因子,如果应用不当,通常会降低鱼类溶菌酶的活性,如菜籽粕显著降低异育银鲫血清溶菌酶的活性^[32]、豆粕显著降低黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)血清溶菌酶的活性^[4]、大豆分离蛋白显著降低虹鳟肝脏溶菌酶活性^[30]、菜粕棉粕替代豆粕显著降低奥尼罗非鱼(*Sarotherodon* sp.)血清溶菌酶活力^[2];虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)血清溶菌酶活性受饲料蛋白质含量的调控,蛋白质营养缺乏会降低虹鳟溶菌酶活性,低蛋白水平比适宜蛋白水平溶菌酶活力低,但是,高水平的蛋白质含量并不能显著提高溶菌酶的活性^[33]。有研究表明,蛋白质营养缺乏时,作为鱼类非特异性免疫能力关键指标的溶菌酶很容易受到影响^[34]。本实验适量玉米蛋白粉(10%)替代鱼粉能提高暗纹东方鲀肝胰脏、头肾和脾脏组织溶菌酶活性,增强免疫力,然而,过量使用则降低其活性(表 3),降低免疫能力。可能是因为随着玉米蛋白粉的使用量增加饲料氨基酸不平衡越趋明显,超过适宜使用量时会导致蛋白质营养胁迫,这与本实验暗纹东方鲀的生长情况相符,当玉米蛋白粉用量在 10% 以内时,饲料中蛋白质营养能满足暗纹东方鲀的需求,增重率和对照组没有显著性差异,但当玉米蛋白粉的用量超过 15% 以后,摄食减少,蛋白质营养缺乏,生长缓慢,增重率明显低于对照组(待发表)。通常鱼类能够通过自我调节分泌更多的溶菌酶来应对外界环境的胁迫^[35],但是,一旦胁迫超过鱼类的自我调节能力,非特异性免疫能力会明显受到抑制^[36],因此,本实验玉米蛋白粉用量超过 15% 的实验组溶菌酶活性会显著降低。

饥饿、细菌感染^[8]及免疫刺激物^[37]等外界因素影响鱼类溶菌酶基因 mRNA 表达。钱曦等^[8]认为饥饿导致异育银鲫 c-型溶菌酶 mRNA 表达和酶活性都降低。Gao 等^[38]用弧菌感染罗氏沼虾,肝胰脏组织溶菌酶表达量比对照组提高了 560%;Yuan 等^[37]对鲤的研究提出,低剂量黄芪多糖能促使其鳃组织溶菌酶基因 mRNA 表达,而高剂量则促使脾脏组织中的溶菌酶基因的表达,但是,两种剂量对头肾中的表达没有影响,这可能是鲤溶菌酶基因表达受黄芪多糖的剂量和组织的特异性共同作用的结果;Low 等^[39]用添加核苷酸

的饲料饲养大菱鲆,显著降低脾脏和肾组织中溶菌酶基因 mRNA 表达,但对鳃组织的表达没有影响。以上结果提示,不论是非营养因素还是营养因素都会对溶菌酶基因 mRNA 的表达产生影响,同时也存在组织特异性。本试验玉米蛋白粉用量显著影响暗纹东方鲀头肾、脾脏和肝胰脏组织 c-型溶菌酶 mRNA 表达,可能是因为适量使用时可充分发挥氨基酸互补的功能,促进蛋白质营养代谢,提高蛋白质的沉积,通过提高营养水平增强鱼体的免疫功能,然而,过量使用时又因破坏氨基酸的平衡,从而产生蛋白质营养胁迫,间接影响溶菌酶等免疫相关基因的表达,从而降低非特异性免疫能力。

玉米蛋白粉用量对于暗纹东方鲀头肾、脾脏和肝胰脏溶菌酶活性以及 c-型溶菌酶 mRNA 表达的影响相似,使用量为 10% 时,溶菌酶活性及 c-型溶菌酶 mRNA 表达量达到最大,超过这个水平,酶活性及 mRNA 表达呈下调趋势,说明饲料蛋白质组成对溶菌酶合成的调控在转录水平已有显著影响。此外,鱼类溶菌酶除了 c-型溶菌酶以外还有 g-型溶菌酶,因此,玉米蛋白粉用量对溶菌酶蛋白合成的调控机制有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 韩斌,黄旭雄,华雪铭,等. 玉米蛋白粉替代部分鱼粉对凡纳滨对虾摄食量、生成和肌肉成分的影响[J]. 水产学报,2009,33(4):658-665.
- [2] 林仕梅,麦康森,谭北平. 菜粕、棉粕替代豆粕对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)生长、体组成和免疫力的影响[J]. 海洋与湖沼,2007,38(2):168-173.
- [3] 蔡春芳,吴康,潘新法,等. 蛋白质营养对异育银鲫生长和免疫力的影响[J]. 水生生物学报,2001,25(6):590-596.
- [4] 杨严鸥,张艳,潘宙,等. 豆粕替代不同水平的鱼粉对黄颡鱼饲料利用、ATP 酶活性和免疫功能的影响[J]. 饲料广角,2005,15:39-41.
- [5] 陈莹,梁运祥,陈昌福. 发酵豆粕饲料对异育银鲫非特异性免疫功能的影响[J]. 淡水渔业,2005,35(2):6-9.
- [6] 刘文斌,詹玉春,王恬. 四种饼粕酶解蛋白对异育银鲫的营养作用研究[J]. 中国粮油学报,2007,22(5):108-112.
- [7] Subbotkina T A, Subbotkin M F. Lysozyme content in organs and blood serum in various species in the Volga River [J]. *Evolutionary Biochemistry and Physiology*,2003,39(5):537-546.
- [8] 钱曦,华雪铭,黄旭雄,等. 异育银鲫 c-型溶菌酶全长 cDNA 序列的生物信息学分析及其组织表达分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2008,24(4):337-347.
- [9] Johnson M R, Wang K S, Smith J B, et al. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction [J]. *Analytical Biochemistry*,2000,278:175-184.
- [10] ABI Prism. Sequence detection system 7 700 user bulletin[M]. Calif:Foster City,2000:3-10.
- [11] Ben B, Ian T B. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants[J]. *Plant Cell Reports*,2004,23:263-271.
- [12] Murray C K, Fletcher T C. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues[J]. *Fish Biol*,1976,9:329-334.
- [13] Fletcher T C, White A. The lysozyme of the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) [J]. *Comp Biochem and Physiol*,1976,55:207-210.
- [14] 王宏田,徐永立,张培军. 假雄牙鲆不同组织中溶菌酶比活性的研究[J]. 海洋科学,2000,24(10):7-8.
- [15] 刘红柏,魏巍. 史氏鲟及小体鲟不同组织中溶菌酶水平的比较[J]. 水产学杂志,2007,20(1):57-60.
- [16] 陈昌福,纪国良. 鱼类的某些“自然抗体”(非特异性免疫物质)的特性及其功能[J]. 鱼类病害研究,1990,12(2):42-48.
- [17] Hansen N E. Plasma lysozyme-a measure of neutrophil turnover. An analytical review [J]. *Acta Baematol*,1974,7:7-8.
- [18] 吴维宁. 团头鲂血细胞发生的研究[J]. 水产学报,1990,14(4):328-335.
- [19] Pulsford A, Tomlinson M G, Lemaire-Gong S, et al. Development and immunocompetence of juvenile flounder *Platichthys flesus*, L. [J]. *Fish & Shellfish Immunol*,1994,4:63-78.
- [20] Rombout J H W M, Bot H E, Taverne-Thiele J J. Immunological importance of the second gut segment of carp. II Characterization of mucosal leucocytes [J]. *Fish Biol*,1989,35:167-178.
- [21] Irwin D M. Evolution of cow nonstomach lysozyme genes [J]. *Genome*,2004,47:1082-1090.
- [22] Irwin D M, Prager E M, Wilson A C. Evolutionary genetics of ruminant lysozymes [J]. *Anim Genet*,

- 1992,23:193-202.
- [23] Kanda Y, Hisayasu S, Abe Y, *et al.* Growthactive peptides are produced from α -lactalbumin and lysozyme[J]. *Life Sci*,2007,81:449-457.
- [24] Yuen S T, Wong M P, Chung L P, *et al.* Up-regulation of lysozyme production in colonic adenomas and adenocarcinomas[J]. *Histopathology*, 1998,32:126-132.
- [25] Zhang K,Gao R,Zhang H, *et al.* Molecular cloning and characterization of three novel lysozyme-like genes, predominantly expressed in the male reproductive system of humans, belonging to the c-type lysozyme/alphalactalbumin family [J]. *Biol Reprod*,2005,73:1064-1071.
- [26] Paulsen S M, Lunde H, Engstand, *et al.* *In vivo* effects of β -glucan and LPS on regulation for lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*,2003,14(1):39-54.
- [27] Wang Y C, Chang P S, Chen H Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunol*,2007,23:1161-1177.
- [28] Schnyder J, Baggiolini M. Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and nonstimulated macrophages [J]. *J Exp Med*, 1978, 148 (2): 435-450.
- [29] Jiménez-Cantizano R M, Infante C, Martin-Antonio B, *et al.* Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*,2008,25:57-65.
- [30] 徐奇友,李婵,杨萍. 用大豆分离蛋白和肉骨粉代替鱼粉对虹鳟生产性能和非特异性免疫指标的影响[J]. *大连水产学院学报*,2008,23(1):8-12.
- [31] 胡兵,刘军,侯永清,等. 酵母细胞壁在异育银鲫饲料中添加效果的研究 [J]. *中国饲料*,2007,20:28-30.
- [32] 赵飞,吴志新,庞素风,等. 菜籽粕对异育银鲫免疫应答能力的影 [J]. *华中农业大学学报*,2007,26(3):361-366.
- [33] Mock A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution [J]. *J Fish Biol*,1990,37:873-885.
- [34] Kiron V, Watanabe T, Fukuda H, *et al.* Protein nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Comp Biochem and Physiol*,1995,111A:351-359.
- [35] Demers N E, Bayne C J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout [J]. *Developmental & Comparative Immunology*,1997,21:363-373.
- [36] Yin Z,Lam T J, Sin Y M. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*,1995,5:519-529.
- [37] Yuan C T, Pan X P, Gong Y, *et al.* Effects of Astragalus polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. [J]. *International Immunopharmacology*, 2008 (8): 51-58.
- [38] Gao F Y, Ye X, Bai J J, *et al.* cDNA cloning and expression characterization of lysozyme gene in two freshwater prawn [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005,29(6):615-620.
- [39] Low C, Wadsworth S, Burrells C, *et al.* Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet [J]. *Aquaculture*, 2003,221:23-40.

Effects of feeding with corn gluten meal on lysozyme activity and c-lysozyme gene expression in *Fugu obscurus*

ZHONG Guo-fang, QIAN Xi, HUA Xue-ming, ZHOU Hong-qi*

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University,
Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: To examine the effects of corn gluten meal on lysozyme activity and c-lysozyme gene expression in *Fugu obscurus*, the fish were fed with diets containing 0%, 5%, 10%, 15% and 20% corn gluten meal in replacement of 0%, 7.4%, 14.8%, 22.2% and 29.6% of conventional fish meal for 60 days, respectively. Lysozyme activities and mRNA levels in the hepatopancreas, head kidney and spleen were examined. The results show that: (1) At the beginning of the experiment, the lysozyme activities of the hepatopancreas, head kidney and spleen were 9.14 U/mg protein, 42.12 U/mg protein and 40.49 U/mg protein, respectively. The c-lysozyme mRNA relative expression levels of head kidney and spleen were 3.76 and 3.24 times of the hepatopancreas. (2) Different amounts of corn gluten meal in the diets exerted different effects on the lysozyme activities. The lysozyme activities of hepatopancreas in the 15% and 20% trial groups were significantly lower than that of the control group, and they significantly increased in the 5% and 10% trial groups. In the head kidney, lysozyme activities were significantly enhanced in the 10% trial group, but they significantly reduced in the 15% and 20% trial groups. In the spleen, there were not significant changes on the enzyme activities in the 5% and 10% trial groups, but in the 15% and 20% trial groups, the enzyme activities significantly reduced. (3) Different amounts of corn gluten meals in the diets also resulted in significant changes in c-lysozyme mRNA levels in tissues. In comparison with the control group, the c-lysozyme mRNA expression levels of hepatopancreas significantly reduced in the 15% and 20% trial groups, although they significantly increased in the 5% and 10% trial groups. In the spleen, there were not significant changes on the c-lysozyme mRNA expression levels in the 5% and 10% trial group, but they were significantly lower in the 15% and 20% trial groups than that of the control group. In the head kidney, c-lysozyme mRNA expression levels were significantly enhanced in the 10% trial group, but they significantly reduced in the 15% and 20% trial groups. In a word, the enzyme activities and c-lysozyme mRNA expression levels were peaked in the 10% corn gluten meal group.

Key words: *Fugu obscurus*; corn gluten meal; lysozyme activity; lysozyme gene expression

Corresponding author: ZHOU Hong-qi. E-mail: hqzhou@shou.edu.cn