

陈秀霞, 黄殿盛, 柯翎, 等. BSA-ISCOMs 对大黄鱼免疫机能及抗病力的影响 [J]. 福建农业学报, 2013, 28 (3): 201-205.
CHEN X-X, HUANG D-S, KE L, et al. Effects of BSA-ISCOMs on Immunity Response and Disease Resistance of *Pseudosciaena crocea* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28 (3): 201-205.

BSA-ISCOMs 对大黄鱼免疫机能及抗病力的影响

陈秀霞, 黄殿盛, 柯翎, 许斌福, 方冬兰, 龚晖

(福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 利用免疫刺激复合物 (ISCOMs) 非特异免疫增强作用和可经黏膜呈递的特点, 将 BSA 制备成 ISCOMs (BSA-ISCOMs), 大黄鱼连续口服免疫 10 d。免疫后第 15 d 和 30 d 采血, 测血清部分非特异性免疫指标。结果显示, 免疫后第 15 d, 试验组血清 SOD、补体 C3、总蛋白含量显著高于对照组 ($P<0.05$), γ -干扰素高于对照组, 但差异不显著 ($P>0.05$), 溶菌酶则显著低于对照组 ($P<0.05$); 免疫后第 30 d, 除溶菌酶外, 试验组各指标与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。免疫完成后第 30 d, 创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 攻毒结果显示, 对照组死亡率 100%, 试验组死亡率 26.7%, 相对免疫保护率为 73.3%。因此, 口服 BSA-ISCOMs 在一定药效期限内能有效提高大黄鱼的免疫机能, 增强抗病能力。

关键词: 牛血清白蛋白 (BSA); 免疫刺激复合物 (ISCOMs); 大黄鱼; 非特异性免疫

中图分类号: S 858.3

文献标识码: A

Effects of BSA-ISCOMs on Immunity Response and Disease Resistance of *Pseudosciaena crocea*

CHEN Xiu-xia, HUANG Dian-sheng, KE Ling, XU Bin-fu, FANG Dong-lan, GONG Hui

(Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: Immune stimulating complex (ISCOMs) is an efficient mucosal delivery system which can induce non-specific immune response. Bovine serum albumin (BSA) was incorporated into ISCOMs (BSA-ISCOMs). *Pseudosciaena crocea* took diets containing BSA-ISCOMs for 10 d, while the control group took diets containing PBS. At the 15th and 30th day after oral completion, serum was collected for non-specific immune parameters analysis. The results showed that at 15th day after oral completion, SOD, C3 and total protein of the fish feeding BSA-ISCOMs were significantly higher than those of the control fish ($P<0.05$), and interferon γ of the former was higher than that of the latter, but not significantly ($P>0.05$), while lysozyme of the former was significantly lower than that of the latter ($P<0.05$). At 30th day after oral completion, these parameters except lysozyme of the experimental group were not significantly different from the control group ($P>0.05$). The results of the challenge with *Vibrio vulnificus* at 30th day after oral completion showed that the cumulative mortality of the control and the experimental group was 100% and 26.7%, respectively, and the relative percent survival (RPS) was 73.3%. So this study indicated that BSA-ISCOMs can induce the immune response and improve the disease resistance of *Pseudosciaena crocea*.

Key words: bovine serum albumin (BSA); immune stimulating complex (ISCOMs); *Pseudosciaena crocea*; non-specific immunity

大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* 是福建省主要网箱养殖海水鱼。近几年, 随着大黄鱼高密度、集约化

养殖的迅速发展, 各种疾病频繁发生。据调查, 每年大黄鱼病害造成的损失大约占总产量的 20%~

收稿日期: 2012-12-27 初稿; 2013-02-08 修改稿

作者简介: 陈秀霞 (1977-), 女, 副研究员, 主要从事鱼类免疫制剂研究 (E-mail: xiuxiachen@163.com)

黄殿盛 (1986-), 男, 硕士, 主要从事鱼类免疫学研究。黄殿盛与陈秀霞对本文内有同等贡献。

通讯作者: 龚晖 (1971-), 男, 研究员, 主要从事鱼类病原学与免疫学研究 (E-mail: ghxfjm@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2011R1021-7、2009R10035-5); 福建省科技平台建设项目 (2009N2003); 福建省海洋与渔业厅重点项目 ([2010] 2-13)

30%，部分地方损失率高达 90%^[1]。当前，网箱养殖过程中防治鱼病主要使用抗生素和杀虫剂等化学药物。这些药物的使用导致耐药菌株增加、环境污染、药物残留等一系列重大环境问题^[2]。疫苗是防治病害的有效手段。目前，国内针对大黄鱼一些主要病害的疫苗研究多数还处在实验室阶段^[3-5]。疫苗针对的是特定的病原，诱导的免疫应答是特异的免疫应答。渔用疫苗的制备及其在渔业实际生产中的广泛应用仍存在着困难。非特异免疫制剂可以弥补化学药物和疫苗的不足，它主要通过激活机体自身的非特异性免疫机能达到增强抗病能力的目的。已有研究表明，一些非特异性免疫制剂，如葡聚糖、维生素 C、壳寡糖、甘草酸等能提高大黄鱼的非特异性免疫机能^[6-9]。涉及的非特异免疫制剂虽然种类繁多，但多数仍处在试验研究中。免疫刺激复合物（Immune Stimulating Complexes, ISCOMs）是由植物皂苷 QuilA、胆固醇、卵磷脂和蛋白（抗原）组成的脂质结构，具有抗原提呈及免疫佐剂的双重功能。ISCOMs 可诱导白介素、干扰素产生，活化 Th 细胞、CTL 细胞、B 淋巴细胞，具有产生全面免疫应答的能力^[10]。本研究室多年从事 ISCOMs 制备及免疫研究，将多种来源的抗原（包括携带嗜水气单胞菌 β -溶血素基因的重组菌、嗜水气单胞菌主要外膜蛋白、创伤弧菌外膜蛋白等）制备成 ISCOMs，用于免疫鳗鲡，获得良好的免疫保护效果^[11-13]。此外，利用溶藻弧菌外膜蛋白制备的 ISCOMs 通过腹腔注射方式免疫大黄鱼获得 50% 的免疫保护率^[4]。但是，病原抗原的嵌入使 ISCOMs 作为疫苗在推广应用上受到限制。

为证实 ISCOMs 的非特异免疫效果，本试验不采用创伤弧菌抗原，而选用标准蛋白牛血清白蛋白（BSA）。BSA 是常用的模式抗原，常用于免疫试验研究，可以嵌入 QuilA 与胆固醇、卵磷脂构成的笼格状结构中，形成稳定的颗粒^[14]。同时 BSA 的嵌入可以降低 QuilA 的溶血性。因此，本研究将 BSA 制备成 ISCOMs（BSA-ISCOMs），口服免疫大黄鱼，通过检测血清部分相关的非特异免疫指标及攻毒保护试验，初步评价 BSA-ISCOMs 对大黄鱼的非特异免疫机能的影响及免疫保护作用，为 ISCOMs 在大黄鱼病害防治中的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 牛血清白蛋白（BSA）购自

Amresco 公司；皂苷 Quil A 为美国 Accurate Chemical & Scientific Corporation 公司产品；卵磷脂为 Amsonic 公司产品；胆固醇为 Sigma 公司产品；考马斯亮蓝 G-250 为 Bio-Rad 公司产品。

超氧化物歧化酶检测试剂盒和溶菌酶检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品，鱼补体蛋白 3 (C3) 酶联免疫检测试剂盒和鱼干扰素- γ (IFN- γ) 酶联免疫检测试剂盒为美国 R&D 公司产品。

1.1.2 试验动物 供试大黄鱼平均体重约 25 g，饲养池平均水温为 22℃。基础饲料为福建省华龙饲料有限公司生产的颗粒配合饲料。试验地点：福建省连江县大官坂。

1.1.3 试验菌株 攻毒用创伤弧菌 *Vibrio vulnificus* 菌株 FJ03-X2，来源于欧洲鳗鲡血液，为本实验室分离、鉴定、保种。

1.2 试验方法

1.2.1 BSA-ISCOMs 的制备及结构观察 参照文献 [15] 制备 BSA-ISCOMs。采用 Bradford 法^[16] 测定其蛋白浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取上述制备的 BSA-ISCOMs $10 \mu\text{L}$ 滴加到铜网上，1 min 后用滤纸从铜网边缘吸走多余的样液，再滴加 $10 \mu\text{L} 2\%$ 醋酸铀，1 min 后用滤纸从铜网边缘吸走多余的染液，白炽灯下烘 15 min。置于透射电镜（JEM-120EX）下观察并拍照。

1.2.2 口服免疫 供试大黄鱼随机分为 2 组，每组 100 尾。试验组投喂添加 BSA-ISCOMs 的基础饲料，对照组投喂饲料添加 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4)。分别连续给药 10 d，给药量为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{尾}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。口服免疫完成后 2 组均投喂基础饲料。

1.2.3 血清采集 BSA-ISCOMs 免疫 10 d 完成后第 15 d 进行第 1 次采血，第 30 d 进行第 2 次采血。每次采血时，分别从各组随机捞取 5 尾供试鱼，尾静脉采血，4℃ 静置过夜，经 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后收集上层血清，-20℃ 保存备用。

1.2.4 免疫指标检测 采集血清样品进行超氧化物歧化酶 (SOD)、溶菌酶 (LZM)、补体 C3 (C3)、干扰素- γ (IFN- γ)、血清总蛋白等免疫指标检测。

SOD 采用南京建成生物工程研究所超氧化物歧化酶测定试剂盒测定（比色法）。将每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量定义为 1 个 SOD 活力单位 (U)。计算公式如下：

总 SOD 活力 = (对照管 OD 值 - 测定管 OD 值) $\times 2 / \text{对照管 OD 值} \times \text{反应体系的稀释倍数} \times \text{样}$

本测定前稀释倍数

LZM 测定采用南京建成生物工程研究所的溶菌酶测定试剂盒 (比浊法)。按下列公式计算溶菌酶含量:

溶菌酶含量=(测定管透光度 UT2—测定管透光度 UT0)/(标准管透光度 ST2—标准管透光度 ST0)×标准管浓度×样本稀释倍数

C3 采用鱼补体蛋白 3 (C3) 酶联免疫检测试剂盒测定。对照标准曲线计算血清补体 C3 含量。

IFN- γ 采用鱼干扰素- γ (IFN- γ) 酶联免疫检测试剂盒测定。对照标准曲线计算血清 IFN- γ 含量。

血清总蛋白采用 Bradford 法测定^[15]。

1.2.5 免疫保护试验

(1) 创伤弧菌复苏、培养: 取创伤弧菌菌株 FJ03-X2 保种液划线接种于含 1% NaCl 的 TSA 平板上, 28℃ 培养过夜。挑取 TSA 培养单菌落接种于含 1% NaCl 的 TSB 培养液中, 于 28℃、转速 180 $r \cdot min^{-1}$ 的摇床培养 24 h。菌液于 3 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min, 沉淀用 PBS 重悬并梯度稀释, 平板计数, 调节菌悬液浓度为 4×10^5 CFU $\cdot mL^{-1}$ 。

(2) 攻毒: 在完成免疫后第 30 d, 试验组随机捞取大黄鱼 24 尾, 对照组取 30 尾大黄鱼进行攻毒试验。根据预攻毒试验结果, 每尾大黄鱼腹腔注射 0.5 mL 菌悬液, 连续观察 10 d, 记录各组死亡率, 根据下列公式计算相对免疫保护率 (RPS)^[17]。

RPS=[1—(受免鱼死亡率/对照鱼死亡率)] \times 100%。

1.2.6 数据处理 数据采用 SPSS 13.0 分析软件进行统计分析, 采用两组间独立样本双尾 T 检验法分析试验各组之间的差异显著性, 结果用平均值

士标准差表示。

2 结果与分析

2.1 BSA-ISCOMs 显微结构

电镜下可见典型的大小约为 40 nm 的笼格状结构。说明 BSA 可以与 Quil A、胆固醇、卵磷脂构成 BSA-ISCOMs。

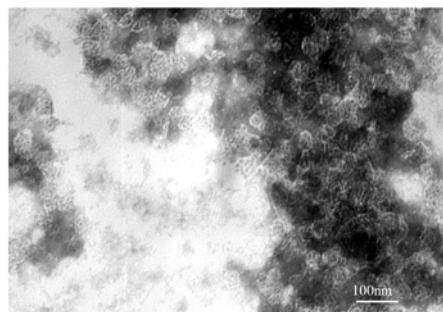


图 1 透射电镜下 BSA-ISCOMs 的结构

Fig. 1 The structure of BSA-ISCOMs under electron microscopy

2.2 BSA-ISCOMs 对大黄鱼血清生化指标的影响

BSA-ISCOMs 口服免疫完成后第 15、30 d 采血, 大黄鱼血清 SOD、LZM、C3、IFN- γ 和总蛋白的检测结果见表 1。口服免疫完成后第 15 d, BSA-ISCOMs 组大黄鱼血清 SOD、C3 和总蛋白含量显著高于 PBS 组 (对照组) ($P < 0.05$); 试验组 IFN- γ 略高于对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 试验组溶菌酶活力则显著低于对照组 ($P < 0.05$)。口服免疫完成后第 30 d, 试验组 SOD、C3、IFN- γ 和总蛋白含量均高于对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 试验组溶菌酶活力仍显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 口服免疫后第 15、30 d 大黄鱼血清生化指标的检测结果

Table 1 Non-specific immune parameters of *P. crocea* fed with BSA-ISCOMs

时间	处理	SOD/ (U $\cdot mL^{-1}$)	LZM/ (U $\cdot mL^{-1}$)	C3/ (ng $\cdot L^{-1}$)	IFN- γ / (ng $\cdot L^{-1}$)	总蛋白/ (mg $\cdot mL^{-1}$)
15 d	BSA-ISCOMs	231.61 \pm 20.72*	80.82 \pm 1.83*	222.59 \pm 14.80*	59.10 \pm 11.29	4.02 \pm 0.17*
	PBS	183.02 \pm 39.32*	138.78 \pm 9.57*	178.77 \pm 6.78*	58.23 \pm 6.89	3.52 \pm 0.24*
30 d	BSA-ISCOMs	278.92 \pm 26.86	91.43 \pm 5.48*	265.66 \pm 30.26	73.59 \pm 13.69	3.59 \pm 0.28
	PBS	253.44 \pm 48.56	164.90 \pm 11.76*	254.21 \pm 34.37	67.65 \pm 13.87	3.26 \pm 0.33

注: * 表示同一采样时间 BSA-ISCOMs 组与 PBS 组差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 BSA-ISCOMs 对大黄鱼的免疫保护作用

口服免疫完成后第 30 d 的攻毒试验结果显示,

供试大黄鱼在人工感染创伤弧菌 5 d 后, 对照组死亡率 100%, 试验组死亡率为 26.7%, 相对免疫保

护率为 73.3% (表 2)。供试大黄鱼在人工感染创伤弧菌后的存活曲线见图 2。

表 2 BSA-ISCOMs 对大黄鱼抗病力的影响

Table 2 The effect of BSA-ISCOMs on the disease resistance of *P. crocea* against *V. vulnificus*

处理	攻毒尾数/尾	攻毒剂量/(CFU·尾 ⁻¹)	死亡率/%	相对免疫保护率/%
BSA-ISCOMs	24	2×10^5	26.7	73.3
PBS	30	2×10^5	100	—

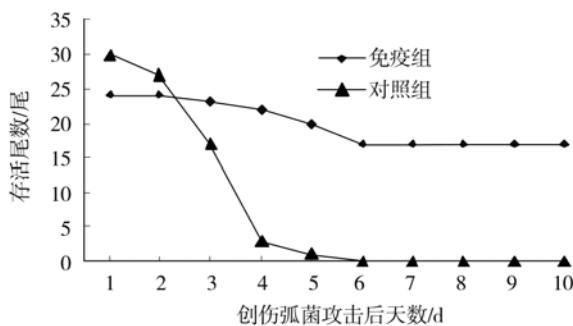


图 2 创伤弧菌攻毒后大黄鱼的存活曲线

Fig. 2 The survival curve of the *P. crocea* changed with *V. vulnificus*

3 讨 论

SOD 是机体内非常重要的抗氧化酶, 在清除自由基、防治生物分子损伤等方面有十分重要的作用^[18]。研究表明, SOD 活力与生物机体的免疫水平密切相关^[19]。鱼类拥有发达的补体系统, 补体 C3 是补体系统的主要成分之一, 激活后的补体 C3 具有细胞溶解、细胞黏附、调理、免疫调节、介导炎症反应、中和毒素、免疫复合物溶解和清除等重要的生物学效应^[20-21]。鱼类血清总蛋白包括白蛋白和球蛋白, 总蛋白含量升高表明白蛋白和球蛋白含量升高, 表明机体免疫因子的分泌增多^[22]。本试验中, 口服免疫完成后第 15 d, BSA-ISCOMs 组大黄鱼血清 SOD、C3 和总蛋白含量显著高于 PBS 组 ($P < 0.05$), 免疫完成后第 30 d, BSA-ISCOMs 组的这 3 个指标仍然高于对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。说明口服 BSA-ISCOMs 在一定的药效期限内可以显著影响大黄鱼的 SOD、C3 和总蛋白含量。

干扰素系统是非特异性免疫系统的重要组成部分, 除了抗病毒作用外, 还参与机体的其他重要生理过程, 如调节细胞生长和分化及机体免疫反应

等^[23]。本试验中, 免疫完成后第 15 d 和 30 d 采血, 试验组的 IFN- γ 高于对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。这说明在本试验剂量下, 连续口服 BSA-ISCOMs 10 d 可能对大黄鱼的干扰素未能产生有效影响, 或者是对干扰素影响的有效期限较短 (低于 15 d), 具体原因有待进一步探讨。

另外, 值得注意的是, 本试验中免疫后第 15 d 和 30 d 采血, 试验组的溶菌酶活力均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。其原因有待进一步研究。但尽管如此, 创伤弧菌攻毒后, 试验组死亡率明显低于对照组, 相对免疫保护率为 73.3%。溶菌酶是鱼类重要的非特异性免疫因子^[24-25]。但目前尚缺乏直接的证据证明溶菌酶活力提高能改善鱼类的抗病能力^[26]。据报道, 原本想利用溶菌酶活力作为大西洋鲑 (*Salmo salar* L.) 和虹鳟 [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)] 亲鱼培育的间接选择标准的研究, 其得出的结果却与预期相反^[27-29]。此外, 溶菌酶通过破坏细菌的细胞壁而使之溶解死亡, 因此主要作用于革兰氏阳性菌, 而对革兰氏阴性菌不敏感。本试验中创伤弧菌为革兰氏阴性菌, 这可能是本试验中大黄鱼血清溶菌酶活力与抗感染能力不相关的另一个原因。

攻毒实验是免疫效果最直观的反映方式。本试验用创伤弧菌攻毒供试大黄鱼, 对照组死亡率 100%, 试验组死亡率 26.7%, 相对免疫保护率为 73.3%。这说明连续 10 d 口服 BSA-ISCOMs 能有效提高大黄鱼的抗病能力。

综上所述, BSA-ISCOMs 能诱导大黄鱼非特异性免疫反应, 增强大黄鱼的抗病能力, 在大黄鱼等经济鱼类病害防治中具有良好的应用前景。

参 考 文 献:

- [1] 谢书秋, 刘振勇. 闽东大黄鱼养殖现状分析与发展对策 [J]. 福建水产, 2006, (3): 95-97.
- [2] ROBERTSEN B, RORSTAD 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]. Journal of Fish Diseases, 1990, 13: 391-400.
- [3] 吴志鹏, 王三英. 三联疫苗对大黄鱼常见细菌性疾病免疫保护的实验研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43 (1): 115-118.
- [4] 许斌福, 林能锋, 俞伏松, 等. 大黄鱼溶藻弧菌外膜蛋白 ISCOMs 的免疫效果初步研究 [J]. 福建农业学报, 2008, 23 (3): 244-246.
- [5] 沈锦玉, 许文军, 尹文林, 等. 哈维氏弧菌灭活疫苗在养殖大黄鱼中的应用与评价 [J]. 大连海洋大学学报, 2010, 25

- (3): 210—213.
- [6] 鄢庆彬, 苏永全, 王军, 等. 口服免疫添加剂对养殖大黄鱼免疫机能影响的初步研究 [J]. 集美大学学报, 2001, 6 (2): 134—137.
- [7] 杨文鸽, 黄晓春, 李花霞, 等. 葡聚糖与其羧甲基衍生物对养殖大黄鱼非特异免疫作用 [J]. 浙江农业学报, 2006, 18 (1): 16—20.
- [8] 徐后国. 几种新型免疫增强剂对大黄鱼幼鱼生长、存活、免疫力及抗病力的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [9] 张春晓, 麦康森, 艾庆辉, 等. 饲料中添加肽聚糖对大黄鱼生长和非特异性免疫力的影响 [J]. 水产学报, 2008, 32 (3): 411—416.
- [10] 叶立林, 支海兵. 免疫刺激复合物 (ISCOMs) 研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2001, 35 (2): 47—51.
- [11] 董传甫, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白对欧洲鳗鲡的免疫保护试验 [J]. 水生生物学报, 2005, 29 (3): 285—290.
- [12] 龚晖, 林天龙, 吴宗福, 等. 嗜水气单胞菌 β -hemA-ISCOMs 对鳗鲡的口服免疫效果 [J]. 福建农业学报, 2006, 21 (4): 325—329.
- [13] 田丁, 许斌福, 林能锋, 等. 创伤弧菌外膜蛋白免疫刺激复合物对欧洲鳗鲡的免疫保护性分析 [J]. 水生生物学报, 2010, 34 (2): 431—435.
- [14] MOREIN B, EKSTRÖM J, LÖVGREN K. Increased immunogenicity of a non-amphipathic protein (BSA) after inclusion into iscoms [J]. Journal of Immunological Methods, 1990, 128 (2): 177—181.
- [15] 方勤美, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌 β -hemA 重组菌表达产物 ISCOMs 的研制 [J]. 福建农业学报, 2004, 19 (4): 238—242.
- [16] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72 (1—2): 248—254.
- [17] AMEND D F. Potency testing of fish vaccines [J]. Developments in Biological Standardization, 1981, 49: 447—454.
- [18] 魏俊发, 俞贤达, 金道森. 锰超氧化物歧化酶及其化学模拟研究 [J]. 化学进展, 1997, 9 (1): 14—21.
- [19] CHIU S H, TSAI R T, HSU J P, et al. Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus* [J]. Aquaculture, 2008, 227: 66—72.
- [20] 李凌, 吴灶和. 鱼类体液免疫研究进展 [J]. 海洋科学, 2001, 25 (11): 20—22.
- [21] 王志平, 张士瑾, 王光锋. 鱼类补体系统成分及补体特异性和功能的研究进展 [J]. 水生生物学报, 2008, 32 (5): 760—769.
- [22] SAKAI M. Current research status of fish immunostimulants [J]. Aquaculture, 1999, 172: 63—92.
- [23] 戴伟, 许梓荣. 鱼类干扰素系统的研究进展 [J]. 水产科学, 2008, 27 (5): 266—270.
- [24] GRINDE B, LIE Ø, POPPE T, et al. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture [J]. Aquaculture, 1988, 68: 299—304.
- [25] ACKERMAN P A, IWAMA G K, THORNTON J C. Physiological and immunological effects of adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2000, 12: 157—164.
- [26] FLETCHER G L, HOBBS R S, EVANS R P, et al. Lysozyme transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Aquaculture Research, 2011, 42: 427—440.
- [27] FEVOLDEN S E, RØED K H, GJERDE B. Genetic components of post-stress cortisol and lysozyme activity in Atlantic salmon; correlations to disease resistance [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1994, 4: 507—519.
- [28] LUND T, GJEDREM T, BENTSEN H B, et al. Genetic variation in immune parameters and associations to survival in Atlantic salmon [J]. Journal of Fish Biology, 1995, 46: 748—758.
- [29] RØED K H, FEVOLDEN S E, FJALESTAD K T. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity [J]. Aquaculture, 2002, 209: 91—101.

(责任编辑: 张 梅)