

pH 胁迫对日本对虾非特异性免疫因子及 RNA/DNA 比值的影响

赵先银^{1,2} 李 健^{2*} 李吉涛² 何玉英² 张 喆² 常志强²

(¹上海海洋大学, 201306)

(²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 研究了 pH 胁迫对日本对虾血清非特异性免疫因子及对虾肌肉 RNA/DNA 比值的影响。结果表明,低 pH 胁迫组(pH 7.2)和高 pH 胁迫组(pH 9.2)总一氧化氮合成酶(TNOS)活力分别在 3、12 h 时达到最大;而诱导型一氧化氮合成酶(INOS)活力在 3 h 时达到最大值,随着胁迫时间的延长,酶活力逐渐降低,至 72 h 趋于稳定,并表现出高 pH 变化免疫适应能力较差的现象。两 pH 胁迫组酚氧化酶(PO)活力呈现峰值变化,在 12 h 时达到最大值,之后逐渐降低,至 72 h 后趋于稳定。溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力随着 pH 胁迫时间的增加而降低,同样表现出高 pH 变化免疫适应能力较差的现象。另外,pH 胁迫条件下日本对虾的肌肉 RNA/DNA 比值显著低于正常对照组日本对虾肌肉的 RNA/DNA 比值,这可能是由于 pH 胁迫影响了对虾体内的物质代谢所致。

关键词 pH 胁迫 日本对虾 非特异性免疫因子 RNA/DNA

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0060-07

Effects of pH stress on non-specific immune factors and RNA/DNA ratio of *Marsupenaeus japonicus*

ZHAO Xian-yin^{1,2} LI Jian^{2*} LI Ji-tao² HE Yu-ying²

ZHANG Zhe² CHANG Zhi-qiang²

(¹Shanghai Ocean University, 201306)

(²Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The effects of pH stress on non-specific immune factors and the RNA/DNA ratio of *Marsupenaeus japonicus* were investigated. It was found that the activity of total nitric oxide synthase (TNOS) in *M. japonicus* of low pH group (pH 7.2) and high pH group (pH 9.2) reached the maximum at 3h and 12h, respectively. The activity of inducible nitric oxide synthase (INOS) in pH stress groups reached the maximum at 3h, then gradually declined and stabilized at 72h. The activity changes of phenoloxidase (PO) in *M. japonicus* under both the low and high pH conditions showed that they reached the peak value at 12h, gradually decreased

公益性农业行业科研专项(200803012)、国家虾产业技术体系(nycytx-46)和国家 863 计划项目(2010AA10A401)共同资助

* 通讯作者。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn, Tel:(0532)85830183

收稿日期:2010-02-03;接受日期:2010-06-30

作者简介:赵先银(1984-),女,硕士研究生,主要从事环境毒理研究。E-mail:zhaoxianyin@hotmail.com, Tel:(0532)85826690

thereafter, and became stable after 72h. Activities of lysozyme, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase in *M. japonicus* decreased gradually under pH stress. The changes of non-specific immune enzymatic activity showed that the immune adaptive activity in *M. japonicus* exposed to the high pH stress was lower than those exposed to the low pH stress. Moreover, the RNA/DNA ratio in the muscle of *M. japonicus* under the pH stress conditions was significantly lower than that of the control group, supposedly due to the effects of pH stress on metabolism of *M. japonicus*.

KEY WORDS pH stress *Marsupenaeus japonicus* Non-specific immune factors
RNA/DNA

对虾是海水养殖的重要品种,目前我国养殖对虾的主要品种有:中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis*、凡纳滨对虾、日本对虾 *Marsupenaeus japonicus*、斑节对虾、长毛对虾、墨吉对虾等。日本对虾是在中国对虾遭到流行病害以后,以其适温性广、生长迅速、抗病力强、耐干露等优点在我国北方沿海地区得到迅速发展,养殖规模不断扩大,全国年产量达 5 万 t。但由于水体环境因子、自身免疫水平及病原微生物等多种因素的影响,日本对虾养殖成活率偏低,已成为提高养殖效益的制约因素(管越强等 2008;齐彦等 2000)。

水体的酸碱度作为水环境生态平衡的指标,是水中化学性状和生命活动的综合反映。pH 对海水鱼虾类的直接影响表现为酸性过强可使鱼虾血液 pH 值下降,从而削弱其载氧能力,造成缺氧症,影响虾的矿化作用,而且低 pH 会增加铁离子、硫离子等物质的毒性;反之,碱性过强的水会加剧水中的氨氮毒害作用(Walton *et al.* 1982;Zimmer *et al.* 1987)。国内外关于 pH 对养殖对虾免疫功能的影响已有相关的研究报告(Wang *et al.* 2009;Zhou *et al.* 2009;潘鲁青等 2002;哈承旭等 2009),但是大多以凡纳滨对虾为研究对象,而日本对虾作为目前一种重要的经济品种则很少有相关研究。核糖核酸与脱氧核糖核酸的比值(RNA/DNA)是动物体内蛋白质合成能力的一种生理指标,其作为生长指标在水产动物中进行了广泛研究。Bulow(1981)、Mastafa(1977)和 Buckley(1979)分别对一些鲤科鱼类以及蓝鳃太阳鱼、红点鲑、小口鲈等鱼类的肌肉、肝脏中的 RNA/DNA 比值与摄食、生长的关系作了研究。结果表明,RNA/DNA 的比值与鱼类生长呈正相关,并确认这一指标是评定鱼类近期及长期生长性能的良好指标(陈庆堂等 2008),另外也有利用 RNA/DNA 比值研究有毒物质(Goolish *et al.* 1984)、温度(Mathers *et al.* 1993)、盐度(Imsland *et al.* 2002)变化对水生生物生长的影响,但是对其比值产生变化的机制和机理还缺乏深入研究。本文研究了 pH 胁迫对日本对虾血清非特异性免疫因子和肌肉 RNA/DNA 比值的影响,为寻找与 pH 胁迫直接相关的免疫指标提供一定的科学依据,同时探讨用 RNA/DNA 比值作为评价环境因子变化对日本对虾生长限制指标的可行性,并为研究 RNA/DNA 比值变化的机制与机理提供一定的数据支持。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用日本对虾取自山东青岛宝荣水产科技发展有限公司,体色正常,健康活泼,生物学体长为 7.2 ± 0.7 cm,体重为 5.3 ± 1.8 g。实验开始前用正常养殖海水暂养 7 d,养殖海水取自山东胶州市附近近海,15 d 沉淀、过滤后使用,经检测水体盐度为 20 ± 1 ,pH 为 8.2,温度为 29.8 ± 0.2 °C,连续充气,日换水 1 次,换水量 $1/3 \sim 1/2$,投喂对虾配合饲料。

1.2 实验方法

1.2.1 pH 浓度梯度的设置

实验设置对照组和实验组,对照组使用正常养殖海水,pH 值为 8.2,低 pH 组和高 pH 组分别设定为 7.2、9.2,分别通过向正常养殖海水中添加 1.0mol/L HCl 或 1.0mol/L NaOH 溶液来调节,水体的实际 pH 值使用

上海三信仪表公司 EC500 型 pH 计测定,实验期间 pH 变化幅度为±0.1。

实验在 200 L 的塑料桶中进行,每桶分别放养健康的日本对虾 15 尾,每个 pH 梯度均设 6 个平行组。在 pH 突变后 0、3、6、12、24、36、48、72、96 h 进行取样,每次取样尾数为 8 尾,整个实验过程不换水,及时剔除死亡个体并记录尾数。

1.2.2 样品制备

用 1 ml 无菌注射器从对虾的腹节处取血淋巴,低温离心(4℃,3 000r/min)10 min,血清用于酶活指标测定;取适量肌肉-20℃保存,用于 RNA/DNA 比值测定。

1.3 血清非特异性免疫因子的测定

1.3.1 一氧化氮合成酶(NOS)的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒的测定方法进行测定。定义每毫升血清每分钟生成 1 nmol NO 为 1 个酶活力单位。

1.3.2 酚氧化酶(PO)活力的测定

以 L-DOPA 为底物,按照雷质文等(2001)改进 Ashida(1971)的方法测定。

1.3.3 溶菌酶(LZM)活力的测定

以溶壁微球菌为底物,采用王雷等(1995)改进的方法进行。

1.3.4 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒的测定方法进行测定。定义每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U)。

1.3.5 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒的测定方法进行测定。规定每 0.1 ml 血清在 37℃ 反应 5 min,扣除非酶促反应作用,使反应体系中还原型谷胱甘肽(GSH)浓度降低 1 μmol/L 为 1 个酶活力单位。

1.4 肌肉 RNA/DNA 的测定

采用 Buckley(1995)和梁萌青等(2008)改进的方法。

1.5 数据分析

利用 SPSS 11.5 和 Excel 软件进行数据处理、单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 处理对日本对虾存活率的影响

不同 pH 处理日本对虾的存活率见表 1。由表 1 可以看出,随着 pH 胁迫时间的延长,试验组日本对虾的存活率有所下降,但差异不显著。低 pH 胁迫组 24 h 存活率开始下降,并趋于稳定;高 pH 胁迫组 48 h 存活率开始逐渐降低,两 pH 胁迫组存活率大小差异不显著。

表 1 不同 pH 处理日本对虾的存活率(%)

Table 1 The survival rate of *Marsupenaeus japonicus* at different pH (%)

pH	时间 Time (h)								
	0	3	6	12	24	36	48	72	96
8.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
7.2	100.0	100.0	100.0	100.0	96.7	96.7	96.7	96.7	96.7
9.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.9	98.9	97.0

2.2 pH 胁迫对日本对虾血清非特异性免疫因子的影响

2.2.1 pH 胁迫对日本对虾血清一氧化氮合成酶活力的影响

日本对虾血清总一氧化氮合成酶(TNOS)和诱导型一氧化氮合成酶(INOS)活力的测定结果分别见图 1 和图 2。结果表明,与对照组 pH 8.2 相比,pH 7.2 胁迫组 TNOS 活力与对照组相比变化幅度不大,总体呈现先短暂升高又逐渐下降的趋势,3 h 时酶活力达到最大值,与对照组差异显著($P < 0.05$),6~48 h 时酶活力逐渐下降,但与对照组差异不显著,72 h 以后酶活力变化显著($P < 0.05$);pH 9.2 胁迫组 TNOS 总体也呈现先升高后逐渐下降的趋势,12 h 达到最大值与对照组差异极显著($P < 0.01$),12 h 后血清 TNOS 活力逐渐下降,与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。pH 胁迫后 INOS 活力与 TNOS 变化趋势相似,pH 7.2 组 INOS 活力与对照组相比变化幅度不大,总体呈现先增后减的趋势,36 h 达到最大值,随后逐渐下降;pH 9.2 组也呈现先增后减的趋势,3 h 达到最大值,与对照组相比差异极显著($P < 0.01$),之后 INOS 酶活力急剧下降。

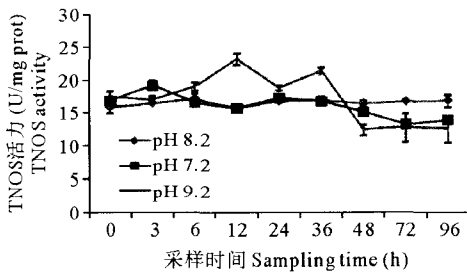


图 1 不同时间、不同 pH 处理日本对虾血清 TNOS 活力
Fig. 1 TNOS activity in blood serum of *M. japonicus* at different time with different pH treatment

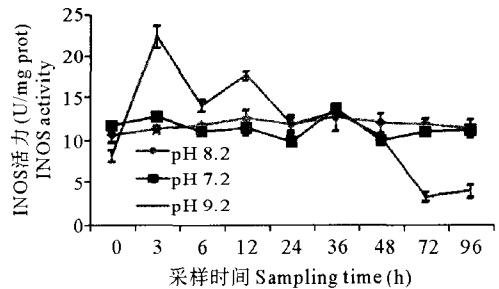


图 2 不同时间、不同 pH 处理日本对虾血清 INOS 活力
Fig. 2 INOS activity in blood serum of *M. japonicus* at different time with different pH treatment

2.2.2 pH 胁迫对日本对虾血清酚氧化酶活力的影响

日本对虾血清 PO 活力的测定结果见图 3。结果显示,与对照组相比,两 pH 胁迫组酶活力逐渐增强,均在 12 h 达到最高峰,与对照组差异极显著($P < 0.01$),随着胁迫时间的延长,PO 活力逐渐下降,两 pH 胁迫组酶活力在 48 h 降低至对照组水平,96 h 显著低于对照组($P < 0.05$)。

2.2.3 pH 胁迫对日本对虾血清溶菌酶活力的影响

日本对虾血清 LZM 活力测定结果见图 4。结果表明,与对照组 pH 8.2 相比,pH 7.2、pH 9.2 胁迫组 0 h LZM 活力变化差异不显著,随着 pH 胁迫时间的延长,LZM 活力逐渐下降且与对照组差异极显著($P < 0.01$)。

2.2.4 pH 胁迫对日本对虾血清超氧化物歧化酶活力的影响

日本对虾血清 SOD 活力的测定结果见图 5。结果表明,pH 胁迫组 0 h SOD 活力与对照组的差异不显著,

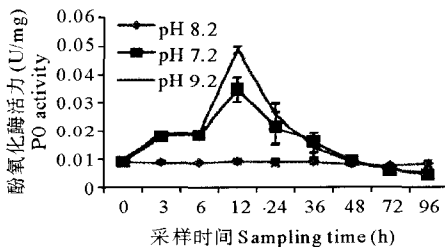


图 3 不同时间、不同 pH 处理日本对虾血清 PO 活力
Fig. 3 PO activity in blood serum of *M. japonicus* at different time with different pH treatment

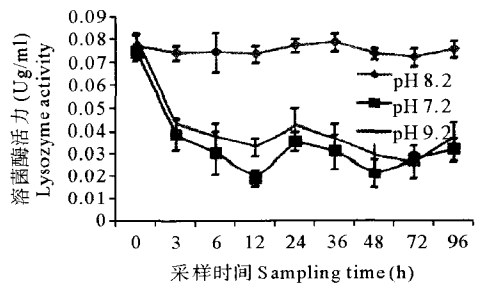


图 4 不同 pH 对日本对虾血清溶菌酶活力的影响
Fig. 4 The effect of pH on Lysozyme activity in blood serum of *M. japonicus* at different time

3 h 以后与对照组相比, pH 7.2 和 pH 9.2 胁迫组差异达到极显著水平($P < 0.01$), 随着 pH 胁迫时间的延长, SOD 活力逐渐下降, 3 h 时两个 pH 胁迫组的 SOD 活力最低。

2.2.5 pH 胁迫对日本对虾血清谷胱甘肽过氧化物酶活力的影响

日本对虾血清 GSH-PX 活力的测定结果见图 6。结果显示, 两组 pH 变化后 GSH-PX 酶活力均急剧下降, 与对照组差异极显著($P < 0.01$); 且 pH 9.2 组显著低于 pH 7.2 组。

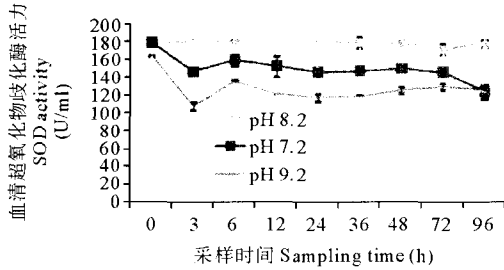


图 5 不同 pH 胁迫日本对虾血清 SOD 活力

Fig. 5 Activity of SOD in blood serum of *M. japonicus* at different time with different pH treatment

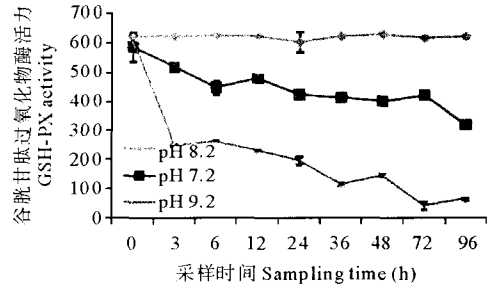


图 6 不同 pH 对日本对虾血清 GSH-PX 酶活力的影响

Fig. 6 The effect of pH on activity of GSH-PX in blood serum of *M. japonicus*

2.3 pH 胁迫对日本对虾肌肉 RNA/DNA 比值的影响

日本对虾肌肉 RNA/DNA 比值的测定结果见图 7。由图 7 可知, pH 8.2 对照组日本对虾肌肉的 RNA/DNA 比值显著高于两个 pH 胁迫组($P < 0.05$)。随着 pH 胁迫时间的延长, 两 pH 胁迫组对虾肌肉 RNA/DNA 比值逐渐下降, 72h 之后两个 pH 胁迫组之间差异达到极显著水平($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 pH 对日本对虾血清非特异性免疫因子的影响

养殖水体是水产动物的生活环境, 水体不仅直接影响水产动物自身的免疫能力, 还会影响水体中饵料生物的组成、数量和分布, pH 作为水环境生态平衡的指标, pH 的变化不仅直接影响对虾的代谢机能, 而且还会影响氮氨、硫化氢和重金属离子等环境因子, 从而间接影响对虾的生长、免疫和存活(Chen *et al.* 1989; 潘鲁青等 2002)。本试验中, 随着 pH 胁迫时间的延长, 试验组日本对虾的存活率下降, 从宏观角度直接反应出 pH 胁迫对日本对虾的存活有一定影响。

本实验中总一氧化氮合成酶和诱导型一氧化氮合成酶、酚氧化酶活力都是随着 pH 胁迫时间的延长先升高后降低。这可能是由于 pH 胁迫后, 通过刺激巨噬细胞数量增多等方式诱导 NOS 系统表达, 从而产生大量的一氧化氮(NO)来对抗环境胁迫, 但随着胁迫时间的延长, 细胞可能受到损失, 也可能通过置换酶活性中心的必需金属或结合到酶分子中的咪唑基、巯基、氨基、肽基等功能基团而降低酶的活性或者导致 NOS 酶失活(Lgnarro 1995)。这与吴天利等(2008)研究报道的镉胁迫对凡纳滨对虾血清中 NOS 的影响结果相似。酚氧化酶活力先上升后降低并且表现出对高 pH 胁迫的免疫适应性较差的现象, 这表明 pH 胁迫激活日本对虾体内的酚氧化酶原系统, 但当这种胁迫达到一定强度后会导致生物代谢混乱, 故又出现下降的趋势。Li 等(2008)研究发现鳃弧菌感染后的凡纳滨对虾酚氧化酶活力下降, Ai 等(2008)报道了 WSSV 感染后的凡纳滨对虾血清酚氧化酶原活力下调, 而本研究中的酚氧化酶活力则是先升高又恢复到正常

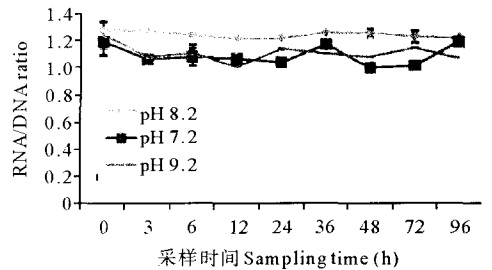


图 7 不同 pH 对日本对虾肌肉 RNA/DNA 比值的影响

Fig. 7 The effect of different pH on the ratio of RNA/DNA in muscle of *M. japonicus*

水平,由此可推断外界病原感染和 pH 胁迫对虾体的酚氧化酶原系统激活机制不同,这正好与 Söderhall 等(1979)的研究报道一致。另有报道低浓度 Ca^{2+} 诱导酚氧化酶激活系统(Golla-Galván *et al.* 1997),由此推测甲壳动物的酚氧化酶原激活系统可能存在多种激活机制。因此,关于 pH 胁迫对日本对虾相关方面的研究还有待进一步深入。

本研究中 LZM、SOD 和 GSH-PX 酶活力随着 pH 胁迫时间延长逐渐降低。LZM 广泛存在于各种动物的血细胞和血液中,是吞噬细胞杀菌的物质基础。王雷等(1995)研究发现,正常中国对虾血淋巴中的 LZM 活力较强,而濒死对虾血淋巴的溶菌活性基本丧失。黄旭雄等(2007)报道弧菌攻击中国对虾后 LZM 活性相比对照组有不同程度的下降。潘鲁青等(2002)也报道了 LZM 活力随着 pH 突变的增加而逐渐降低。这些都与本实验的研究结果一致。说明 pH 条件的改变使日本对虾的抗菌能力下降,对病原菌的易感性提高。SOD 广泛存在于真核生物体内,是生物体防御氧化损伤的重要抗氧化酶类。在哈承旭等(2009b)的研究报道中,pH 8.4 胁迫 72 h 后“黄海 1 号”中国对虾 SOD 活力显著高于对照组,但随着 pH 值的继续增大,中国对虾的 SOD 活力出现下降,说明应激强度加大时,对虾机体的免疫功能受到抑制,正常生理功能失调,体内免疫水平下降,导致 SOD 活力降低,本实验中低和高 pH 应激组 SOD 活力随着应激时间的增加逐渐下降,正好与上述结果相似,由于日本对虾持续处于较强的 pH 应激状态,导致生物代谢混乱,机体的免疫保护能力受到抑制,SOD 活性降低(哈承旭等 2009a)。

GSH-PX 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶,它特异地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用(王雷等 1994)。本实验中,GSH-PX 活力随着胁迫时间延长而降低,可能是由于 pH 的突变使得对虾血液中的 GSH 降低,而 GSH 是组织中主要的非蛋白质的巯基化合物,并且是 GSH-PX 和谷胱甘肽硫转移酶(GST)两种酶的底物,为这两种酶分解过氧化氢所必需,并且 GSH 能稳定含巯基的酶和防止血红蛋白及其他因子受氧化损伤。所以 GSH 含量的降低会促使许多化学物质或环境因素产生中毒作用或加重其中毒作用,从而增加氧化损伤(张昌颖 1978)。

从以上的研究结果分析可知,日本对虾血清 PO、LSZ、SOD 和 GSH-PX 活力对 pH 胁迫较敏感,可以作为反应日本对虾抵御 pH 刺激的免疫防御指标,从高、低 pH 的变化还可以得出日本对虾表现出高 pH 免疫适应能力较差的现象。

3.2 pH 胁迫对日本对虾肌肉 RNA/DNA 比值的影响

关于 RNA/DNA 比值的研究,刘存歧等(2006)认为,用 RNA/DNA 指标能较好指示日本沼虾的生长状况,而且虾体肌肉 RNA/DNA 比值变化较肝胰腺 RNA/DNA 变化显著,虾体肌肉内的 RNA/DNA 比值能更好地评价虾体的生长情况。梁萌青等(2008)也测得凡纳滨对虾肌肉中的 RNA 和 DNA 含量比较稳定,而且 RNA/DNA 比值与生长呈正相关。本实验中随着 pH 突变时间的增加,日本对虾肌肉 RNA/DNA 比值逐渐降低。这可能是由于养殖水体 pH 的突变,扰乱了对虾机体的新陈代谢,对虾自身为了维持正常的生命活动不得不耗能来抵抗环境的胁迫毒害,从而用于合成蛋白质的能量减少,使 RNA/DNA 比值降低。这反映出 pH 胁迫对日本对虾生长的抑制,但是对于 RNA/DNA 比值变化的机制和机理尚未有精确的定论,还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 王雷,李光友,毛远兴. 1994. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究. 海洋与湖沼,26(1):34~42
- 王雷,李光友,毛远兴. 1995. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究. 海洋与湖沼,27(2):179~185
- 齐彦,辛月霖. 2000. 北方地区日本对虾养殖经济效益的综合评价. 河北渔业,4:39~41
- 刘存歧,沈会涛,吴玲玲. 2006. 日本沼虾体内 RNA/DNA 比值与其生长关系的研究. 河北大学学报,26(5):524~528
- 张昌颖. 1978. 生物化学(第 2 版). 北京:人民卫生出版社,520~521
- 吴天利,李广丽,师尚丽,吴灶和,朱春华. 2008. 镉胁迫对凡纳滨对虾血清中一氧化氮合成酶和超氧化物歧化酶活性的影响. 热带海洋学报,27(6):62~65

- 陈庆堂,胡 兵,张蕉南. 2008. RNA/DNA 比值在水产动物研究中的应用. 饲料工业, 29(2):30~31
- 哈承旭,刘 萍,何玉英,李 健,李 霞. 2009a. 氯化铵对“黄海 1 号”中国对虾免疫相关酶类的影响. 渔业科学进展,30(1):34~40
- 哈承旭,刘 萍,何玉英,李 健,李 霞. 2009b. 高 pH 胁迫对“黄海 1 号”中国对虾免疫相关酶的影响. 中国水产科学,16(2):303~306
- 黄旭雄,周洪琪,宋 理. 2007. 急性感染对中国明对虾非特异性免疫水平的影响. 水产生物学报,31(3):325~330
- 梁萌青,王士隐,王家林,常 青. 2008. 海水养殖与低盐养殖凡纳滨对虾生长性能、酶活及 RNA/DNA 比值的差异. 海洋水产研究,29(4):69~73
- 雷质文,黄 健,杨 冰,俞开康. 2001. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究. 中国水产科学,8(4):46~51
- 管越强,俞志明,宋秀贤. 2008. 主要环境因子的对虾类免疫反应及疾病发生的影响. 海洋环境科学,27(5):554~560
- 潘鲁青,姜令绪. 2002. 盐度、pH 突变对 2 种养殖对虾免疫力的影响. 青岛海洋大学学报,32(6):903~910
- Ashida, M. 1971. Purification and characterization of pre-prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm, *Bombyx Mori*. Arch. Biochem. Biophys. 144(2): 749~762
- Ai, H. S., Huang, Y. C., Li, S. D., Weng, S. P., Yu, X. Q., and He, J. G. 2008. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology, 25: 28~39
- Buckly, L. J. 1979. Relationships between RNA/DNA ratio, prey density, and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhus*) larvae. J. Fish. Res. Board Can. 36: 1 497~1 502
- Bulow, F. J. 1981. Seasonal variation in RNA/DNA ratios in indicators of feeding, reproduction, energy storage, and condition in population of Blue-gill, *Lepomis macrochirus* Ratinesque. J. Fish. Biol. 18(3):237~244
- Chen, J. C., and Sheu, T. S. 1989. Effect of ammonia at different pH on *P. japonicus* postlarvae. Mclean, J. L., Dizon, L. B., Hosillo, L. V., Editors. 2nd Asian Fish, Pilippines; Asian Fish. Soc. 61~64
- Goolish, E. M., Barron, M. G., and Adelman, I. R. 1984. Thermoacclimatory response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: influence of growth rate and relationship to glycine uptake by scales. Can. J. Zool. 62: 2 164~2 170
- Gollas-Galván, T., Hernández-Láopes, J., and Vargas-Albores, F. 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 117A: 419~425
- Imsland, A. K., Foss, A., Bonga, S. W. van Ham, E., and Stefansson, S. O. 2002. Comparison of growth and RNA: DNA ratios in three populations of juvenile turbot reared at two salinities. J. Fish Biol. 60: 288~300
- Lgnarro, L. J. 1995. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. Kidney Int. 55(Suppl): S2~S5
- Li, C. C., Yeh, S. T., and Chen, J. C. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. Fish and Shellfish Immunology, 25: 853~860
- Mastafa, S. 1977. Influence of maturation on the concentrations of RNA and DNA in the flesh the catfish, *Clarias batrachus*. Trans. Am. Fish. Soc. 36:449~551
- Mathers, E. M., Houlihan, D. F., McCarthy, I. D., and Burren, L. J. 1993. Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*; effects of age and temperature. J. Fish Biol. 43: 245~263
- Söderhall, K., and Unestam, T. 1979. Activation of crayfish serum prophenoloxidase: The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins. Can. J. Microbiol. 25:406~414
- Walton, W. E., Compton, S. M., Allan, J. D., and Daniels, R. E. 1982. The effect of acid stress on survival and reproduction of *Daphnia pulex* (Crustacea; Cladocera). Can. J. Zool. 60(4): 573~579
- Wang, W. N., Zhou, J., Wang, P., Tian, T. T., Zheng, Y., Liu, Y., Mai, W. J., and Wang, A. L. 2009. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. Comp. Biochem. Physiol. 10(6): 428~435
- Zimmer, D. J. 1987. Effects of low pH acclimation on cladocerans: Clues to the interaction of physiology and ecology of acid lake zooplankton. In: Witters H. and Vanderborgh O. (Editors). Ecophysiology of Acid Stress in Aquatic Organisms. Ann. Soc. R. Zool. Belg. 117(1): 139~149
- Zhou, J., Wang, W. N., Wang, N. L., He, W. Y., Zhou, Q. T., Liu, Y., and Xu, J. 2009. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 12(4): 1~7