

## 饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾免疫 相关基因表达及抗菌机能的影响

黄旭雄<sup>1,2,3\*</sup>, 罗词兴<sup>1</sup>, 危立坤<sup>1</sup>, 陈春燕<sup>1</sup>,  
赵利斌<sup>1</sup>, 李 桑<sup>1</sup>, 刘林林<sup>1</sup>, 曾蓓蓓<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

3. 上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物遗传育种中心, 上海 201306)

**摘要:** 为了评估饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾免疫灵敏性和平衡性的相关基因表达的影响,以鱼粉含量为 24.5% 的基础饲料(对照组)及在基础饲料中添加 2.5% 酵母提取物的实验饲料,分别饲喂凡纳滨对虾 56 d,检测两种饲料投喂的对虾在急性感染溶藻弧菌前后鳃组织 Toll 受体、IMD 和溶菌酶 mRNA 表达量变化及感染后的对虾死亡情况。结果表明:摄食添加酵母提取物饲料的凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量均显著高于对照组对虾 ( $P < 0.05$ ),IMD mRNA 表达量与对照组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。急性感染溶藻弧菌后,两组对虾鳃组织 Toll 受体、IMD 和溶菌酶 mRNA 表达量随感染进程均出现显著变化,Toll 受体、IMD 和溶菌酶 mRNA 表达量峰值出现的时间分别为 24、42 和 36 h,且摄食添加酵母提取物组对虾各基因的表达量峰值分别为对照组峰值的 201.06%、481.46% 和 276.77%,均显著高于对照组对虾 ( $P < 0.05$ )。摄食添加酵母提取物饲料组对虾鳃组织中 Toll 受体和 IMD mRNA 表达量在感染溶藻弧菌后 12 和 24 h 分别出现显著上调,而对照组对虾鳃组织中 Toll 受体和 IMD mRNA 表达量分别在感染弧菌后 24 和 42 h 才出现显著上调。两组对虾经溶藻弧菌人工急性感染后 72 h 内的累积死亡率无显著差异 ( $P > 0.05$ )。实验表明,饲料中添加酵母提取物上调了溶藻弧菌感染前凡纳滨对虾 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 的表达量,提早了溶藻弧菌感染后对虾 Toll 受体和 IMD mRNA 表达量上调时间,且增加了对虾 Toll 受体、IMD 和溶菌酶 mRNA 表达量的峰值,在一定程度上提高了凡纳滨对虾免疫相关基因表达的灵敏性。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 酵母提取物; Toll 受体 mRNA; IMD mRNA; 溶菌酶 mRNA; 溶藻弧菌  
**中图分类号:** S 963 **文献标志码:** A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是我国当前产量最大的养殖对虾。近年来,高密度养殖模式下应激和疾病的暴发严重制约了凡纳滨对虾养殖产业的健康发展和养殖效益的提高。传统的“有病用药”的病害应对策略在对虾养殖实践中往往难以获得理想的效果,并可能引起病原抗药性、环境污染、产品药物残留等问题<sup>[1-2]</sup>。基于优

化饲料配方和营养组成从而达到改善对虾自身免疫抗病机能的营养免疫学方法是应对对虾病害暴发的新途径和研究热点。

凡纳滨对虾不具备脊椎动物的获得性免疫系统,仅有一个开放的、完整的先天免疫防御体系<sup>[3-4]</sup>。IMD 和 Toll 信号传导途径是虾体中调节先天免疫的重要免疫信号传导系统<sup>[5]</sup>,Toll 受

收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-10-12

资助项目:上海市科委地方高校能力建设项目(14320502000);上海市科技兴农项目(沪农科推字(2013)第 2-1 号);上海高校水产学一流学科建设项目

通信作者:黄旭雄,E-mail:xxhuang@shou.edu.cn

体和 IMD 蛋白均具有将特定异物入侵的信号由细胞外向细胞内传递并引起细胞产生一系列级联反应形成免疫效应因子(如抗菌肽)的功能。IMD 在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中参与革兰氏阴性细菌的入侵信号的传导<sup>[6]</sup>。凡纳滨对虾 IMD 基因已被克隆出来,其 mRNA 在神经系统、鳃、肠和幽门盲肠中表达量较高,而在眼柄、血细胞、肌肉、心脏和肝胰腺表达量较低,并发现其能诱导抗菌肽基因的表达<sup>[7]</sup>。凡纳滨对虾<sup>[8-10]</sup>、斑节对虾(*Penaeus monodon*)<sup>[11]</sup>、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[12]</sup>、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)<sup>[13]</sup>等多种对虾 Toll 受体基因已克隆, Toll 受体基因在对虾的血和鳃组织中表达较高<sup>[8,14]</sup>。对虾类 Toll 受体基因的表达水平可以在一定程度上反映机体的免疫灵敏性,在营养免疫学研究中具有重要价值<sup>[15]</sup>。研究表明,饲料中不同水平的 Vc<sup>[16]</sup>、铜<sup>[17]</sup>、锌<sup>[18]</sup>都会影响 Toll 受体基因的表达,从而在一定程度上改变对虾的免疫抗病机能。有关营养素对对虾 IMD 基因表达的影响尚未见报道。

酵母因其蛋白质含量高, B 族维生素含量丰富,含有免疫多糖( $\beta$ -1,3-葡聚糖、甘露聚糖)和未知促生长因子<sup>[19]</sup>,在水产饲料中常用作蛋白原。将酵母细胞在特定工艺下水解形成的酵母提取物,富含游离氨基酸、核苷酸、免疫多糖、小肽、B 族维生素、矿物质等,可用作水产动物促生长和免疫调节的添加剂<sup>[20-22]</sup>。酵母提取物对鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[23]</sup>、白梭吻鲈(*Sander*

*luciperca*)<sup>[24]</sup>、南亚野鲮(*Labeo rohita*)<sup>[25]</sup>等鱼类的免疫调节作用已有报道。王武刚等<sup>[26]</sup>用酵母提取物替代配方中 15%、30%、45% 和 60% 鱼粉,分别饲喂凡纳滨对虾,发现未进行人工感染的对虾鳃组织 Toll 受体 mRNA 的表达量不因替代而有显著改变( $P > 0.05$ )。而酵母提取物作为饲料添加剂应用是否会影响凡纳滨对虾 Toll 受体和 IMD 基因表达的研究未见报道。

本实验研究了在饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾在溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)急性感染前后不同时刻鳃组织 Toll 受体、IMD 和溶菌酶 mRNA 表达量的变化,以期评估酵母提取物对凡纳滨对虾免疫抗病机能的影响,为对虾免疫饲料研发及无公害对虾养殖实践提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料的制备

根据凡纳滨对虾的营养需求,设计了鱼粉含量为 24.5% 的基础饲料(表 1),在基础饲料中添加 2.5% 的酵母提取物制成实验饲料。饲料原料购自上海农好饲料有限公司,酵母提取物由上海利鼎生物饲料有限公司提供。将饲料原料进行超微粉碎,并过 80 目筛。然后按饲料配方用逐级扩大法混合均匀,加入适当的水,用实验制粒机压制直径 1.5 mm 条状饲料,经熟化、风干后压碎成 1.5~2.0 mm 的颗粒饲料,并真空包装置于 4℃ 保存备用。

表 1 基础饲料配方及营养组成

Tab.1 Ingredients and nutritional composition of basal feed formula

原料 ingredients	配比/% ratio	原料 ingredients	配比/% ratio
鱼粉 fish meal	24.5	啤酒酵母 beer yeast	3.0
大豆粕 soybean meal	14.5	血粉 blood meal	6.5
花生粕 peanut meal	9.0	复合添加剂 compound additive *	2.0
菜籽粕 rapeseed meal	6.5	鱼油 fish oil	2.5
面粉 flour	26.5	磷脂油 phosphatide oil	1.5
虾糠 shrimp bran	3.5		
<b>营养组成/% nutritional composition **</b>			
粗蛋白 crude protein	41.55	灰分 ash	9.12
粗脂肪 crude lipid	6.84	总能/(MJ/kg) calculated gross energy	18.62

注: \* 复合添加剂由上海海洋大学营养饵料研究室研制,含虾用多维和多矿等成分。 \*\* 总能为理论计算值<sup>[27]</sup>,其余均为实测值

Notes: \* the compound additive containing vitamins and minerals, was supplied by aqua animal nutrition and feed lab of Shanghai Ocean University. \*\* the gross energy was calculated as reference<sup>[27]</sup> and the others were detected

## 1.2 实验用虾及养殖管理

实验用虾购于上海乐依对虾养殖合作社。挑选健康、活力好的幼虾,随机分在 8 个悬挂于 4 m×4 m×1 m 水泥池中的网箱(1.2 m×1.2 m×0.8 m)中,每个网箱 50 尾虾,初始体质量为(3.08±0.23)g。正式实验开始前先投喂基础饲料一周,然后分别投喂实验饲料,每组 4 个平行。养殖 8 周,日投喂量为虾体质量的 3%~5%。每天投喂 4 次,分别在 6:00、12:00、18:00 和 23:00。每 3 天换一次水,换水量小于总水体 1/3,养殖期间连续充气保持溶解氧 > 4 mg/L,氨氮 < 0.4 mg/L,亚硝基氮 < 0.02 mg/L, pH 值在 8.0~8.5,水温(32±3)℃。

## 1.3 溶藻弧菌急性感染实验

**溶藻弧菌的培养及制备** 溶藻弧菌菌种来自上海海洋大学病原库,在 TCBS 固体培养基上涂布培养 24 h 后,刮取菌斑用适量生理盐水稀释成菌悬液用于人工急性感染实验。

**溶藻弧菌急性感染** 养殖 56 d 后,从各饲料组随机取蜕皮间期的对虾 36 尾,分成 3 个平行,饲养于塑料箱中,对每尾虾腹部注射 30 μL 1×10<sup>7</sup> CFU/mL 菌液。攻毒期间水温 23~25℃,72 h 连续观察并记录对虾死亡情况。

另每组随机选取处于蜕皮间期的对虾 60 尾,每个饲料组 4 个平行。每尾虾尾部腹肌注射 30 μL 9×10<sup>6</sup> CFU/mL 菌液。感染后对虾置于 8 个 120 L 的水族箱中,并连续充气,水温 23~25℃。在弧菌感染后不同时刻取样。

## 1.4 样品的采集

在溶藻弧菌急性感染前及感染后 3、6、12、24、36 和 42 h 分别从每组中随机取 4~6 尾活虾的鳃组织,于液氮中速冻,然后转移至 -80℃ 冰箱中保存,用于鳃组织 Toll 受体、IMD、溶菌酶 mRNA 表达量的测定。

## 1.5 Toll 受体、IMD、溶菌酶 mRNA 表达量的测定

**RNA 的提取及 cDNA 的合成** 按照 TRIzol 试剂(TaKaRa 公司)说明书提取 -80℃ 冻存的对虾鳃组织总 RNA。提取的总 RNA 用 BIO-RAD SmartSpec plus 测定 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 值进行定量检测,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性, -80℃ 保存备用。

按照 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit With gDNA

Eraser(Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa 公司)说明书将提取的总 RNA 反转录为 cDNA。在 0.2 mL 的无 RNA 酶 PCR 管中加入 Total RNA 1 μg、5×g DNA Eraser Buffer 2 μL、gDNA Eraser 1 μL,并补充 RNase Free dH<sub>2</sub>O 至 10 μL,于 PCR 仪上 42℃ 2 min 去除基因组 DNA。在反应液中加入 5×PrimeScript<sup>®</sup> Buffer2(for Real Time)4 μL、PrimeScript<sup>®</sup> RT Enzyme Mix I 1 μL、RT Primer Mix 1 μL、RNase Free dH<sub>2</sub>O 4 μL 至 20 μL,于 PCR 仪上 37℃ 15 min,85℃ 5 s 反转录为 cDNA, -20℃ 保存备用。

**实时荧光定量 PCR 分析基因表达** 参照凡纳滨对虾 Toll 受体基因(GenBank:DQ923424.1)、IMD 基因(GenBank:FJ592176.1)溶菌酶基因(GenBank:AY170126.2)和 β-actin 基因(GenBank:AF300705)设计荧光定量引物(表 2)。引物均由上海瀚宇生物科技有限公司合成。

按照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TliRNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa 公司)说明书,用 Bio-rad Real-time CFX96 进行荧光定量 PCR。PCR 程序为 95℃、20 s 预变性;95℃、5 s,60℃、30 s,共 39 个循环;反应后 55.0℃ 上升至 95.0℃ 测定溶解曲线检测反应特异性。每个复孔以 β-actin 为参照基因。基因表达结果采用相对表达量的形式,以 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法<sup>[28]</sup>进行计算。

表 2 凡纳滨对虾溶菌酶基因、Toll 受体基因、IMD 基因与 β-actin 参照基因引物序列  
Tab.2 Primer pairs for lysozyme, Toll receptor, IMD and β-actin genes for *L. vannamei*

引物 primer	序列 sequence
β-actin-SQF	CGCGACCTCACAGACTACCT
β-actin-SQR	CTCGTAGGACTTCTCCAGCG
Lysozyme-SQF	GTTCCGATCTGATGTCCGATG
Lysozyme-SQR	AAGCCACCCAGGCAGAATAG
Toll receptor-SQF	TGAGAGATGCCCACTGCCTG
Toll receptor-SQR	CGCTTGAAGGTTTGTGAGGGAG
IMD-L134-F	ATACATCCTGCCGTTGCCGA
IMD-L3-R	CCGAGATGGGTTCCCTTGT

## 1.6 数据处理和统计分析

实验结果用平均数±标准差(mean±SD)表示,使用 SPSS 17.0 分析软件进行显著性差异分析。组内不同时刻数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 氏法多重比较;组间数据进行独立样本 T 检验,P<0.05 则认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾鳃组织中免疫相关基因表达的影响

摄食添加酵母提取物饲料的凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量都显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), IMD mRNA 表达量与对照组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (图 1)。

### 2.2 饲料中添加酵母提取物对感染溶藻弧菌的凡纳滨对虾鳃组织中免疫相关基因表达的影响

急性感染溶藻弧菌后,对照组对虾鳃组织 Toll 受体 mRNA 的表达量在 24 h 时达到峰值,并显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ),之后开始下降,42 h 时基本恢复至初始水平 ( $P > 0.05$ )。摄食添加酵母提取物饲料组对虾鳃组织 Toll 受体 mRNA 表达量在 3 h 显著下降,然后恢复,在 12 h 时就显著高于 0 h,直至 24 h 时达到峰值,之后开始下降,42 h 时基本恢复至初始水平 ( $P > 0.05$ )。在 0、12、24、36 和 42 h 时摄食添加酵母提取物饲料组对虾鳃组织中 Toll

受体 mRNA 表达量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。其他时刻两组之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (表 3)。

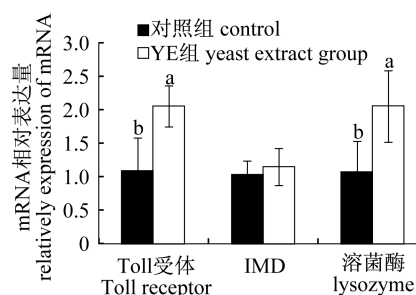


图 1 饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体、IMD、溶菌酶 mRNA 相对表达量的影响 ( $n = 6$ )

上标不同字母表示同一基因不同组别表达量差异显著 ( $P < 0.05$ )

Fig. 1 Effects of dietary yeast extract supplementation on mRNA expression levels of Toll receptor, IMD and lysozyme in gill of the shrimp ( $n = 6$ )

Different superscript letters on the same gene indicate significant differences between the different groups ( $P < 0.05$ )

表 3 凡纳滨对虾感染溶藻弧菌后鳃组织中不同时刻的 Toll 受体 mRNA 相对表达量 ( $n = 4$ )

Tab. 3 Toll receptor mRNA expression levels in gill of the shrimp at different times after *V. alginolyticus* challenge ( $n = 4$ )

组别 group	Toll 受体 mRNA 相对表达量 relative expression level of Toll receptor mRNA						
	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	36 h	42 h
对照组 control	1.08 ± 0.49 <sup>bcdeY</sup>	0.59 ± 0.15 <sup>de</sup>	1.15 ± 0.26 <sup>bc</sup>	1.34 ± 0.26 <sup>bY</sup>	2.82 ± 0.11 <sup>aY</sup>	0.40 ± 0.03 <sup>eY</sup>	0.73 ± 0.05 <sup>cdeY</sup>
YE 组 yeast extract group	2.04 ± 0.30 <sup>cX</sup>	0.47 ± 0.04 <sup>e</sup>	2.16 ± 0.29 <sup>bc</sup>	2.73 ± 0.12 <sup>bX</sup>	5.67 ± 0.26 <sup>aX</sup>	1.07 ± 0.33 <sup>deX</sup>	1.59 ± 0.36 <sup>cdX</sup>

注:上标不同字母 a, b, c, d, e 表示同一组不同时刻差异显著 ( $P < 0.05$ ), 上标不同字母 X, Y 表示同一时刻不同组差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同  
Notes: Data in the same line with different lowercase (a, b, c, d and e) were significantly different among the different time in the same group. Data in the same column with different letters (X and Y) were significantly different among the different groups at the same time ( $P < 0.05$ ). The same as the following

急性感染溶藻弧菌后,对照组对虾鳃组织 IMD 表达量在 42 h 达到峰值,并显著高于 0 h ( $P < 0.05$ )。摄食添加酵母提取物饲料组对虾鳃组织 IMD 表达量在 24 h 就显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ),之

后继续升高,42 h 时达到峰值。在 36 和 42 h 时摄食添加酵母提取物饲料组对虾鳃组织中 IMD mRNA 表达量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。其他时刻两组之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。

表 4 凡纳滨对虾感染溶藻弧菌后鳃组织中不同时刻的 IMD mRNA 相对表达量 ( $n = 4$ )

Tab. 4 IMD mRNA expression levels in gill of the shrimp at different times after *V. alginolyticus* challenge ( $n = 4$ )

组别 group	IMD mRNA 相对表达量 relative expression level of IMD mRNA						
	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	36 h	42 h
对照组 control	1.02 ± 0.22 <sup>bc</sup>	0.68 ± 0.28 <sup>c</sup>	0.73 ± 0.19 <sup>c</sup>	1.11 ± 0.32 <sup>bc</sup>	1.43 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.08 <sup>bY</sup>	2.05 ± 0.48 <sup>aY</sup>
YE 组 yeast extract group	1.14 ± 0.28 <sup>d</sup>	0.84 ± 0.13 <sup>d</sup>	1.05 ± 0.09 <sup>d</sup>	1.54 ± 0.49 <sup>cd</sup>	1.85 ± 0.19 <sup>c</sup>	2.94 ± 0.18 <sup>bX</sup>	9.87 ± 0.74 <sup>aX</sup>

急性感染溶藻弧菌后,两组对虾鳃组织溶菌酶 mRNA 表达量均在 3 h 显著下降 ( $P < 0.05$ ),然后恢复,在 24 h 时显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ),直至 36 h 达到峰值,之后下降,但 42 h 时仍显著高

于 0 h ( $P < 0.05$ )。在 0、36 和 42 h 摄食添加酵母提取物饲料组对虾鳃组织中溶菌酶 mRNA 表达量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。其他时刻两组之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (表 5)。

表 5 凡纳滨对虾感染溶藻弧菌后鳃组织中不同时刻的溶菌酶 mRNA 相对表达量 ( $n = 4$ )Tab. 5 Lysozyme mRNA expression levels in gill of the shrimp at different times after *V. alginolyticus* challenge ( $n = 4$ )

组别 group	溶菌酶 mRNA 相对表达量 relative expression level of lysozyme mRNA						
	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	36 h	42 h
对照组 control	1.07 ± 0.45 <sup>cY</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.62 ± 0.39 <sup>c</sup>	2.60 ± 0.68 <sup>c</sup>	18.69 ± 3.25 <sup>b</sup>	33.36 ± 3.21 <sup>aY</sup>	28.33 ± 7.65 <sup>aY</sup>
YE 组 yeast extract group	2.05 ± 0.53 <sup>dX</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>e</sup>	2.25 ± 0.33 <sup>d</sup>	3.75 ± 0.90 <sup>d</sup>	22.31 ± 6.12 <sup>c</sup>	92.33 ± 9.34 <sup>aX</sup>	77.64 ± 10.18 <sup>bX</sup>

从凡纳滨对虾感染溶藻弧菌后 42 h 内鳃组织中 Toll 受体 mRNA、IMD mRNA 和溶菌酶 mRNA 相对表达量波动 (图 2) 可知,摄食添加酵

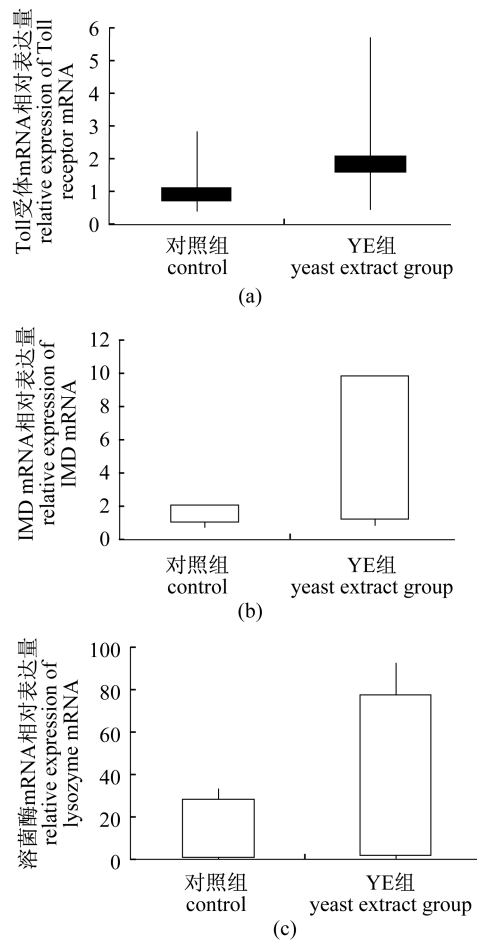


图 2 凡纳滨对虾感染溶藻弧菌后 42 h 内鳃组织中 Toll 受体 mRNA (a)、IMD mRNA (b) 和溶菌酶 mRNA (c) 相对表达量变化图

黑色箱体表示开始时刻的数值大于结束时刻的数值,空白箱体表示开始时刻的数值小于结束时刻的数值。箱体上引线表示变化的最大值,箱体下引线表示变化的最小值

Fig. 2 Candlestick charts of Toll receptor mRNA (a), IMD mRNA (b) and lysozyme mRNA (c) expression levels in gill of the shrimp in 42 h after *V. alginolyticus* challenge

The black box indicates the initial value greater than the end value. The blank box indicates the initial value smaller than the end value. The lead on the box indicates the maximum of the variation. The lead under the box indicates the minimum of the variation

母提取物组对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA、IMD mRNA 和溶菌酶 mRNA 的相对表达量变化幅度均大于对照组对虾。在 42 h 时,两组对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 相对表达量基本恢复感染前的初始水平,而 IMD mRNA 和溶菌酶 mRNA 相对表达量均高于初始水平。

### 2.3 饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾抗溶藻弧菌能力的影响

图 3 为摄食不同饲料凡纳滨对虾经人工急性感染溶藻弧菌后 72 h 累积死亡率情况。在 12、24、36 和 48 h 时摄食添加酵母提取物组对虾累积死亡率略高于对照组,而在 60 和 72 h 时添加酵母提取物组对虾累积死亡率略低于对照组,但各时刻两组对虾之间均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

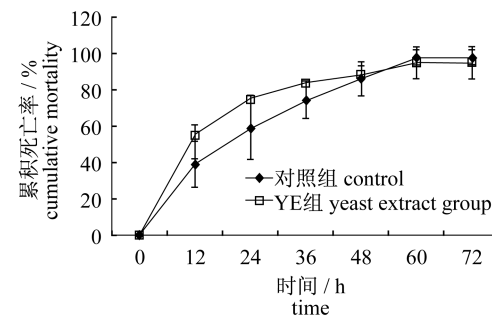


图 3 饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾人工急性感染溶藻弧菌后累积死亡率的影响

Fig. 3 Effects of dietary yeast extract supplementation on cumulative mortality of *L. vannamei* after *V. alginolyticus* challenge

## 3 讨论

Toll 受体是凡纳滨对虾先天免疫反应中重要的信号传导因子,当微生物入侵时,其能将入侵的信号从细胞外传递至细胞内,并诱发下游一系列级联反应,调控抗菌肽等免疫基因的表达<sup>[29-31]</sup>。Wang 等<sup>[9]</sup>报道凡纳滨对虾受到溶藻弧菌及哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*)<sup>[32]</sup> 感染后,Toll 受体 mRNA 表达量会显著上调。本实验中两组凡纳滨对虾感

染溶藻弧菌后鳃组织中 Toll 受体 mRNA 的表达量都会显著变化 ( $P < 0.05$ ), 表明凡纳滨对虾 Toll 受体参与革兰氏阴性菌感染后的免疫信号的传递。而在果蝇中, Toll 信号途径被认为只参与革兰氏阳性菌和真菌的免疫反应<sup>[6,33]</sup>。Yang 等<sup>[12]</sup>用灭活的鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染中国明对虾后, 发现 Toll 受体基因的表达量在注射后 5 h 内显著下降, 8 h 时开始显著上调, 直至 23 h 时达到最大值。本实验中, 溶藻弧菌感染后, 凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 的表达量随感染进程呈先抑后扬的变化。这与上述结果相类似。

已有研究显示饲料中添加不同含量的 Vc<sup>[16]</sup>、锌<sup>[18]</sup>和铜<sup>[17]</sup>能够调节对虾鳃组织中 Toll 受体的表达量及抗菌能力。表明饲料中营养素水平不单影响对虾生长, 也影响对虾的免疫识别机能及免疫抗菌能力。本实验中摄食添加酵母提取物饲料的凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 的表达量在未经人工感染弧菌时显著高于未添加组 ( $P < 0.05$ )。本实验表明, 饲料中添加酵母提取物会影响凡纳滨对虾 Toll 受体的信号途径。然而, 王武刚等<sup>[26]</sup>的研究发现, 用酵母提取物部分替代鱼粉养殖凡纳滨对虾 42 d 后, 对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 的表达量在未经人工感染时无显著变化 ( $P > 0.05$ )。由此可见, 酵母提取物作为添加剂使用或替代鱼粉使用对凡纳滨对虾鳃组织 Toll 受体 mRNA 的表达量有不同影响, 这或许与实验饲料中鱼粉含量、养殖时间及虾规格等不同因素有关, 有待进一步深入研究。

IMD 位于细胞内, 与跨膜的模式识别受体蛋白结合后能引起胞内的一系列免疫反应, 从而使 Relish 蛋白进入细胞核激活抗微生物肽基因表达<sup>[29,34]</sup>。在果蝇中, IMD 参与革兰氏阴性细菌入侵后的免疫识别反应, 能够将革兰氏阴性细菌入侵的信号传递到细胞内并产生一系列的级联反应<sup>[34-35]</sup>。Wang 等<sup>[7]</sup>用灭活的溶藻弧菌感染对虾 6 h 后肝胰脏和血细胞中 IMD 基因表达量显著上调, 但不能使鳃组织中 IMD 基因表达量显著上调, 也并未检测溶藻弧菌感染后其他时刻的 IMD 基因表达量。本实验中, 饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾弧菌感染前鳃组织中 IMD 基因的表达无显著影响, 感染后 6 h 对虾鳃组织中 IMD mRNA 的表达量也未显著升高 ( $P > 0.05$ ),

但在感染 42 h 时 IMD mRNA 的表达量显著高于 0 h ( $P < 0.05$ )。这表明凡纳滨对虾鳃组织 IMD mRNA 的表达量与溶藻弧菌的感染进程有关。

溶菌酶广泛存在于水产动物中, 是水产动物先天免疫重要的生物防御效应物。当对虾受到弧菌感染后, 溶菌酶基因会被诱导表达, 从而参与机体抗菌免疫反应<sup>[36-41]</sup>。本实验中凡纳滨对虾受到溶藻弧菌感染后, 鳃组织中溶菌酶 mRNA 表达量随着感染进程呈先抑制后上升的变化。黄旭雄等<sup>[42]</sup>对哈维弧菌感染后的中国明对虾的研究也发现其腹肌溶菌酶活性在感染初期会受到抑制。这与本实验中溶藻弧菌感染早期凡纳滨对虾鳃组织中溶菌酶 mRNA 表达量下降相类似。

在饲料中添加 50 mg Zn/kg 组 (锌含量为 73.25 mg Zn/kg 饲料) 凡纳滨对虾鳃组织中的溶菌酶 mRNA 表达量显著高于未添加锌组和添加 150 mg Zn/kg 组 ( $P < 0.05$ ), 且使对虾的免疫抗菌机能得到改善<sup>[18]</sup>。饲料中添加富含核苷酸的酵母提取物使日本囊对虾淋巴器官中溶菌酶基因表达量升高, 并增强其抗菌能力<sup>[43]</sup>。本研究中摄食添加酵母提取物饲料的凡纳滨对虾鳃组织中溶菌酶 mRNA 的表达量在未经人工感染弧菌时显著高于未添加组 ( $P < 0.05$ )。上述研究表明, 饲料中营养素水平能影响溶菌酶基因的表达, 从而影响对虾的抗菌机能。

提高机体免疫力的本质不是单纯提高某个免疫指标的水平, 而是提高机体免疫的灵敏性和平衡性, 即机体对侵入体内的异物能够迅速产生充分的反应并在异物清除后能恢复正常状态<sup>[44]</sup>。前期研究中发现, 不同剂量的溶藻弧菌感染也会影响凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体、IMD 和溶菌酶 mRNA 的表达<sup>[45]</sup>。在本实验中, 实验组和对照组在感染相同剂量溶藻弧菌后对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA、IMD mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量的变化轨迹表明, 饲料中添加酵母提取物提高了凡纳滨对虾免疫反应中鳃组织 Toll 受体、IMD 和溶菌酶基因表达量变化的灵敏性, 但不影响 Toll 受体 mRNA 表达的平衡性。在感染后 42 h 时, 两组对虾鳃组织中 IMD mRNA 和溶菌酶 mRNA 相对表达量均仍高于初始水平。考虑到 Toll 受体 mRNA、IMD mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量峰值出现的时间分别为 24、42 和 36 h, 若延长溶藻弧菌感染后对

虾上述基因表达量变化的检测时间,是否 IMD mRNA 和溶菌酶 mRNA 相对表达量能恢复至初始水平,有待进一步深入研究。

综上所述,饲料中添加酵母提取物上调了凡纳滨对虾溶藻弧菌感染前 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 的表达量及感染后 Toll 受体、IMD 和溶菌酶 mRNA 表达量的峰值,并影响 Toll 受体和 IMD mRNA 表达量的变化规律,表明饲料中添加酵母提取物在一定程度上改变了凡纳滨对虾的免疫识别和免疫效益因子的基因表达水平,提高了这些基因表达灵敏性,但在本研究中,这些基因表达量的变化并未能与急性弧菌感染后的对虾成活率结果相对应,可能与急性感染实验中感染剂量等条件选择有关。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Xu B, Ji W S, Zhang P, *et al.* Comparison of antibacterial agents for control of pathogens in cultured shrimp, *Penaeus orientalis* [ J ]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1993, 23 ( 2 ) : 43 - 51. [ 许兵, 纪伟尚, 张鹏, 等. 对虾病原菌抑菌药物的研究. 青岛海洋大学学报, 1993, 23 ( 2 ) : 43 - 51. ]
- [ 2 ] Boyd C E, Massaut L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture [ J ]. Aquacultural Engineering, 1999, 20 ( 2 ) : 113 - 132.
- [ 3 ] Smith V J, Chisholm J R S. Non-cellular immunity in crustaceans [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 1992, 2 ( 1 ) : 1 - 31.
- [ 4 ] Liu X L, Yu W Y. A review on immune factors of crustacean [ J ]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27 ( 4 ) : 418 - 421. [ 刘雪兰, 余为一. 甲壳动物免疫因子的研究进展. 水生生物学报, 2003, 27 ( 4 ) : 418 - 421. ]
- [ 5 ] Li F H, Xiang J H. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34 ( 4 ) : 973 - 980.
- [ 6 ] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [ J ]. Annual Review of Immunology, 2007, 25 : 697 - 743.
- [ 7 ] Wang P H, Gu Z H, Huang X D, *et al.* An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes [ J ]. Molecular Immunology, 2009, 46 ( 8 - 9 ) : 1897 - 1904.
- [ 8 ] Yang L S, Yin Z X, Liao J X, *et al.* A Toll receptor in shrimp [ J ]. Molecular Immunology, 2007, 44 ( 8 ) : 1999 - 2008.
- [ 9 ] Wang P H, Liang J P, Gu Z H, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls ( LvToll2 and LvToll3 ) and three putative Spätzle-like Toll ligands ( LvSpz1-3 ) from *Litopenaeus vannamei* [ J ]. Developmental & Comparative Immunology, 2012, 36 ( 2 ) : 359 - 371.
- [ 10 ] Ye M Y, Liu L P, Dai X L, *et al.* Cloning and sequence analysis of cDNA encoding toll like receptor in *Litopenaeus vannamei* [ J ]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17 ( 3 ) : 263 - 267. [ 叶旻玉, 刘利平, 戴习林, 等. 凡纳滨对虾 Toll 受体基因 cDNA 片段的克隆及序列分析. 上海水产大学学报, 2008, 17 ( 3 ) : 263 - 267. ]
- [ 11 ] Arts J A J, Cornelissen F H J, Cijssouw T, *et al.* Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23 ( 3 ) : 504 - 513.
- [ 12 ] Yang C J, Zhang J Q, Li F H, *et al.* A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24 ( 5 ) : 564 - 574.
- [ 13 ] Mekata T, Tomoya K, Yoshida T, *et al.* Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24 ( 1 ) : 122 - 133.
- [ 14 ] Huang X X, Luo C X, Guo T F, *et al.* The expression differences on Toll receptor mRNA and lysozyme mRNA among tissues of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [ J ]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21 ( 1 ) : 28 - 32. [ 黄旭雄, 罗词兴, 郭腾飞, 等. 凡纳滨对虾 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 组织表达的差异研究. 上海海洋大学学报, 2012, 21 ( 1 ) : 28 - 32. ]
- [ 15 ] Huang X X, Luo C X, Guo T F, *et al.* Toll receptor in prawn and its application in nutrition-immunity assessing on prawn [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36 ( 6 ) : 930 - 936. [ 黄旭雄, 罗词兴, 郭腾飞, 等. 对虾 Toll 受体及其在虾类营养免疫中的应用. 水产学报, 2012, 36 ( 6 ) : 930 - 936. ]
- [ 16 ] Feng W, Li J, Li J T, *et al.* Effects of supplemental different level Vc on survival and non-specific immunity of Chinese shrimp ( *Fenneropenaeus chinensis* ) [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35 ( 2 ) : 200 - 208. [ 冯伟, 李健, 李吉涛, 等. Vc 对中国对虾非特异免疫因子及 TLR/NF- $\kappa$ B 表达量的影响. 水产学报, 2011, 35 ( 2 ) : 200 - 208. ]
- [ 17 ] Guo T F, Huang X X, Su M, *et al.* Effect of copper

- level in diet and feeding time on the immunity, Vibrio-resistant ability, lysozyme mRNA and Toll receptor mRNA expressions in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(5): 809 – 816. [郭腾飞, 黄旭雄, 苏明, 等. 饲料铜水平对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 免疫抗菌能力及 Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达的影响. 水生生物学报, 2012, 36(5): 809 – 816.]
- [18] Guo T F, Huang X X, Su M, *et al.* Effect of zinc level in diet on the immunity, Vibrio-resistant ability, lysozyme mRNA and Toll receptor mRNA expressions in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(7): 1081 – 1089. [郭腾飞, 黄旭雄, 苏明, 等. 饲料锌添加水平对凡纳滨对虾免疫抗菌机能和溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 表达的影响. 水产学报, 2011, 35(7): 1081 – 1089.]
- [19] Zeng H. Quality and classification on yeast diets [J]. Fisheries of China, 2001, 12(5): 86. [曾红. 酵母类饲料的分类和品质. 中国水产, 2001, 12(5): 86.]
- [20] Zhao S M, Han J H. Application on yeast in aquaculture [J]. China Fisheries, 2003(7): 68 – 69. [赵述森, 韩继宏. 浅谈酵母在水产养殖上的应用. 中国水产, 2003(7): 68 – 69.]
- [21] Luo X H, Xiao K Y. Application on yeast and its products in aquaculture [J]. Journal of Beijing Fisheries, 2008, 111(2): 6 – 8. [罗小华, 肖克宇. 酵母及其培养物在水产养殖中的应用. 北京水产, 2008, 111(2): 6 – 8.]
- [22] Liu L H, Yao J, Li B, *et al.* Application on live feed from yeast in aquaculture [J]. Feed research, 2010, (10): 34 – 36. [刘立鹤, 姚娟, 李彪, 等. 酵母源生物饲料在水产养殖中的应用. 饲料研究, 2010, (10): 34 – 36.]
- [23] Biswas G, Korenaga H, Takayama H, *et al.* Cytokine responses in the common carp, *Cyprinus carpio* L. treated with baker's yeast extract [J]. Aquaculture, 2012, 356 – 357: 169 – 175.
- [24] Jarmołowicz S, Zakeś Z, Siwicki A, *et al.* Immunomodulatory effect of dietary brewer's yeast extract in *Sander lucioperca* juveniles against the challenge of *Aeromonas salmonicida* [J]. Aquaculture International, 2013, 21(4): 939 – 945.
- [25] Andrews S R, Sahu N P, Pal A K, *et al.* Yeast extract, brewer's yeast and *Spirulina* in diets for *Labeorohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromona shydrophila* challenge [J]. Research in veterinary science, 2011, 91(1): 103 – 109.
- [26] Wang W G, Luo C X, Huang X X, *et al.* The effect of replacement of fish meal by yeast extract on the immunity, Vibrio-resistant ability, lysozyme mRNA and Toll receptor mRNA expressions of the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(6): 1003 – 1010. [王武刚, 罗词兴, 黄旭雄, 等. 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾免疫抗菌机能和溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 表达的影响. 上海海洋大学学报, 2012, 21(6): 1003 – 1010.]
- [27] LI A J. Aquatic animal nutrition and feed science [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996. [李爱杰. 水产动物营养与饲料学. 北京: 中国农业出版社, 1996.]
- [28] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [29] Hoffmann J A. The immune response of *Drosophila* [J]. Science, 2003, 426(6): 33 – 38.
- [30] Gay N J, Keith F J. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor [J]. Nature, 1991, 351(6325): 355 – 356.
- [31] Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann J A, *et al.* Activation of *Drosophila* Toll During Fungal Infection by a Blood Serine Protease [J]. Science, 2002, 297(5578): 114 – 116.
- [32] Wang K H, Tseng C W, Lin H Y, *et al.* RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(1): 49 – 58.
- [33] Li F H, Xiang J H. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 39(1 – 2): 11 – 26.
- [34] Georgel P, Naitza S, Kappler C, *et al.* *Drosophila* Immune Deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis [J]. Developmental Cell, 2001, 1(4): 503 – 514.
- [35] Kim T, Kim Y. Overview of innate immunity in *Drosophila* [J]. Journal of biochemistry & molecular biology, 2005, 38(2): 121 – 127.
- [36] Burge E J, Madigan D J, Burnett L E, *et al.* Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific



- white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(4):327-339.
- [37] De-la-Re-Vega E, García-Galaz A, Díaz-Cinco M E, et al. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria; *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(3):405-408.
- [38] Fall J, Kono T, Tanekhy M, et al. Expression of innate immune-related genes of Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, after challenge with *Vibrio nigripulchritudo* [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(22):2426-2433.
- [39] Soonthornchai W, Rungrassamee W, Karoonuthaisiri N, et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(1):19-28.
- [40] Tyagi A, Khushiramani R, Karunasagar I, et al. Antivibrio activity of recombinant lysozyme expressed from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4):246-253.
- [41] Yao C L, Wu C G, Xiang J H, et al. The lysosome and lysozyme response in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* to *Vibrio anguillarum* and laminarin stimulation [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2008, 363(1-2):124-129.
- [42] Huang X X, Zhou H Q, Song L P. The effect of acute infection on the innate immune activities of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(3):325-331. [黄旭雄,周洪琪,宋理平.急性感染对中国明对虾非特异免疫水平的影响.水生生物学报,2007,31(3):325-331.]
- [43] Biswas G, Korenaga H, Nagamine R, et al. Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2012, (366-367):40-45.
- [44] Huang X X, Zhou H Q. The parameters reflected immune state of crustacea and its scientific evaluation [J]. *Marine Science*, 2007, 31(7):90-96. [黄旭雄,周洪琪.甲壳动物免疫机能的衡量指标及科学评价.海洋科学,2007,31(7):90-96.]
- [45] Luo C X, Huang X X, Zhao L B, et al. The expressions of Toll receptor, IMD and lysozyme mRNA in gills of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after acute challenge of *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of Fishery Science of China*, 2014, 21(1):189-196. [罗词兴,黄旭雄,赵利斌,等.溶藻弧菌感染后凡纳滨对虾鳃组织免疫相关基因的表达.中国水产科学,2014,21(1):189-196.]

## Effects of dietary yeast extract supplementation on the immune-related gene expressions and vibrio-resistant ability in *Litopenaeus vannamei*

HUANG Xuxiong<sup>1,2,3\*</sup>, LUO Cixing<sup>1</sup>, WEI Likun<sup>1</sup>, CHEN Chunyan<sup>1</sup>,  
ZHAO Libin<sup>1</sup>, LI Sang<sup>1</sup>, LIU Linlin<sup>1</sup>, ZENG Beibei<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai University Knowledge Service Platform, Shanghai Ocean University Aquatic Animal Breeding Center, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The basal diet containing 24.5% fish meal as control, and experiment diet (YE group) with 2.5% yeast extract in basal diet, were fed to the white shrimp *Litopenaeus vannamei* respectively for 56 d, then the mRNA expression levels of Toll receptor, IMD and lysozyme in gills and Vibrio-resistance of the both shrimp were detected for assessing the effect of dietary yeast extract on sensitivity and balance of immune-related gene expression of shrimp. The results showed that: The shrimp fed the experiment diet displayed significantly increased mRNA expressions of Toll receptor and lysozyme in gills compared with the shrimp fed the control diet ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in IMD mRNA expression level in gills between YE group and the control ( $P > 0.05$ ). The relative mRNA expression levels of Toll receptor, IMD and lysozyme of the two groups changed significantly after *Vibrio alginolyticus* challenge, and the peak of the gene expressions appeared at 24, 42 and 36 h respectively in both groups. The peaks of the gene expression of Toll receptor, IMD and lysozyme in YE group were 201.06%, 481.46% and 276.77% of those in the control, and significantly higher than those in the control ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of Toll receptor and IMD in YE group significantly up-regulated at 12 and 24 h respectively while at 24 and 42 h respectively in the control after Vibrio challenge. There was no significant difference in 72 h cumulative mortality after *V. alginolyticus* infection between the two groups. It is therefore suggested that yeast extract added in diet significantly up-regulated the relative mRNA expression levels of Toll receptor and lysozyme in gills of *L. vannamei* before *V. alginolyticus* challenge, led to significant up-regulations of the relative mRNA expression levels of Toll receptor and IMD early and increased the peaks of the relative mRNA expression levels of Toll receptor, IMD and lysozyme in gills of the shrimp after *V. alginolyticus* challenge. This result implied that dietary yeast extract improved the sensitivity of the immune related genes expression of the shrimp to some extent.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; yeast extract; Toll receptor mRNA; IMD mRNA; lysozyme mRNA; *Vibrio alginolyticus*

**Corresponding author:** HUANG Xuxiong. E-mail: xxhuang@shou.edu.cn