

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14540

聚 β -羟基丁酸酯对凡纳滨对虾抗 WSSV 能力及免疫基因表达量的影响

邓康裕^{1,2}, 孔杰², 孟宪红², 罗坤², 栾生², 曹宝祥², 刘宁²

1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 本实验采用单因子浓度梯度法, 以添加不同质量分数(0.0%, 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5.0%, 10.0%)聚 β -羟基丁酸酯(PHB)的人工配合饲料饲喂凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)20 d 后, 对其进行白斑综合症病毒(WSSV)感染测试; 利用实时荧光定量 PCR 技术分析 PHB 对凡纳滨对虾抵御 WSSV 侵染能力的影响, 并选择最高免疫保护率(RPS)组进行不同时间点基因表达量分析。研究发现, PHB 对感染 WSSV 对虾的存活率无显著影响($P>0.05$); 但感染 WSSV 的对虾平均存活时间随 PHB 浓度上升呈现先上升后下降再上升的趋势, 饲喂 PHB 对虾的平均存活时间均高于对照组, 其中 1.0% PHB 浓度组对虾平均存活时间最长, 且显著高于空白对照组及 5.0% PHB 浓度组($P<0.05$)。分析各组对虾体内病毒含量, 发现 1.0% PHB 浓度组对虾病毒含量在实验前期显著低于对照组($P<0.05$)。对虾感染 WSSV 后, 对对照组及 1.0% PHB 实验组对虾前 48 h 内 6 个采样时间点的超氧化物歧化酶(sod)、过氧化氢酶(cat)、谷胱甘肽过氧化物酶(gsh-px)、溶菌酶(lzm)及抗菌肽(abp)5 个基因进行表达趋势分析, 结果表明基因表达趋势在两组间无显著区别; 投喂 PHB 的对虾在感染 WSSV 后血淋巴中 sod、cat、gsh-px 和 lzm 表达量呈现上升后下降再上升的趋势且分别在 6 h、6 h、3 h、6 h 达到最大值; abp 在 WSSV 感染 3 h 内急速下降, 随后在 12 h 达到最大值后又下降; 另外饲喂 PHB 对虾体内免疫基因表达量均高于对照组。结果说明, PHB 能够提高凡纳滨对虾对 WSSV 的抵抗力, 且在一定程度上提高了对虾的免疫力。

关键词: 聚 β -羟基丁酸酯; WSSV; 抗病力测试; real-time PCR; 非特异性免疫; 凡纳滨对虾

中图分类号: 973.73

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-0877-10

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)属节肢动物门(Arthropoda), 甲壳纲(Crustacea), 十足目(Decapoda), 游泳亚目(Natantia), 对虾科(Penaeidae), 滨对虾属。凡纳滨对虾于 20 世纪 80 年代末引入中国大陆后, 得到大规模的推广养殖, 与中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)并称为世界三大经济虾类, 为三大养殖对虾中单产最高的对虾品种。凡纳滨对虾具有繁殖期长、生长快、抗病力强、营养要求低、对水环境适应能力较强等特点, 能在 pH 7.5~8.5^[1]、水

温 8~47℃^[2]、盐度范围 1~50^[3]的水域中生存, 是广温广盐性的热带虾类。我国已选育出“科海 1 号”(2010)、“中科 1 号”(2010)、“中兴 1 号”(2010)、“桂海 1 号”(2012)等凡纳滨对虾养殖新品种, 然而, 我国凡纳滨对虾养殖仍是风险与机遇并存, 尤其是白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)、桃拉病毒(Taura Virus)、黄头病毒(Yellow Head Virus, YHV)和弧菌病的流行造成的养殖风险, 以及不稳定的市场因素等是我国凡纳滨对虾养殖业面临的主要困境。研究表明, 对虾在胁迫

收稿日期: 2014-12-18; 修订日期: 2015-02-02.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31372523, 31172402).

作者简介: 邓康裕(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: dengkangyu@yeah.net

通信作者: 孟宪红, 研究员. E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn

条件下产生的氧自由基等物质容易使生物体发生脂质过氧化, 免疫机能降低, 这是许多疾病发生的基础^[4-5]。鉴于使用药物容易造成生境污染及药物残留, 使用疫苗和免疫增强剂来提高对虾自身的免疫力及抗病力, 成为解决问题的重要途径。

大量研究表明, 饲料中的营养物质对对虾的免疫水平有影响。目前, 国内外学者使用有益微生物、免疫制剂等活性物质, 通过浸泡或投喂的方法, 如在饲料中添加壳聚糖^[6]、益生菌^[7]、维生素 C^[8]、中草药物质^[9]、维生素 E 及 DHA^[10]等物质, 来提高养殖对象机体的非特异性免疫功能, 从而达到防病治病的目的^[11-12]。口饲是免疫增强剂最普遍的使用方法。短链脂肪酸具有抑菌、降低动物肠道 pH 值和促进营养物质吸收利用等广泛的生理功能, 是一种具有应用前景的生物活性物质和饲料添加剂^[13-14]。聚 β -羟基丁酸酯(poly- β -hydroxybutyrate, PHB)是短链脂肪酸 β -羟基丁酸的聚合体, 它广泛存在于微生物细胞中, 是营养及能量储存物质参与细胞代谢的天然产物。研究发现, 饲料中添加 PHB 具有促进动物生长及抗致病性病菌感染能力^[15]。但鲜见 PHB 是否能提高水产动物抗病毒能力的报道。

本实验通过在饲料中添加不同浓度的聚 β -羟基丁酸酯投喂凡纳滨对虾, 利用实时荧光定量 PCR 技术对比饲喂添加 PHB 的实验组与空白对照组对虾感染 WSSV 后的病毒含量差异, 探讨 PHB 对凡纳滨对虾幼虾抗病毒能力的影响; 并研究 PHB 对感染 WSSV 的对虾血淋巴中非特异性免疫基因表达的影响, 以期开发一种新的免疫增强剂, 为 PHB 投入生产实践提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验对虾取自青岛国家海洋科学研究中心培育的凡纳滨对虾幼虾, 平均体重 3.95~4.52 g; 实验前暂养 1 周, 暂养期间投喂基础饲料驯化 1 周, 实验前 1 天停止喂食。实验用海水为天然海水, 盐度 31。

1.2 饲料及制备

基础饲料配方由中国水产科学研究院黄海水产研究所食品工程与营养研究室提供。PHB 由宁波天安生物材料有限公司提供。实验饲料在基础饲料配方上分别添加 0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0% 的 PHB, 采用逐级放大方式混合原料, 饲料原料经过 60 目粉碎, 制成直径为 2 mm, 长度为 3 mm 的颗粒。制粒后放于密封袋内, 存放于通风干燥区域。

1.3 实验管理

将 1500 尾实验对虾平均分为 6 组(A、B、C、D、E、F), A 组(即对照组)投喂不含 PHB 的基础饲料, B、C、D、E、F(均为实验组)依次投喂含 PHB 为 0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0% 的饲料, 每天投喂 3 次(7:00, 13:30, 22:00), 日投喂量为体重的 5%, 每天换水 1 次, 每次换水量为 1/2, 养殖期间水温 24℃。饲养 20 天后从各组中挑取 180 尾(每组设 6 重复, 30 尾/重复), 每重复饲养于 73 cm×53 cm×44.6 cm 的塑料箱中用于进行 WSSV 感染实验。每组中 3 个重复用于 RNA 样本提取, 3 个重复用于计算感染 WSSV 后存活率。

1.4 抗 WSSV 感染能力测试

1.4.1 WSSV 悬液制备 WSSV 悬液制作及含量测定参照孙成波等^[16]的方法。病毒检测所用引物及探针参考 Durand 等^[17]。标准品为本实验室自行制备。实验使用 Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time)(TaKaRa)测定, 每个样品平行检测 3 次, 取平均值作为该样品的病毒含量值。经测定悬液中 WSSV 含量为 10^7 copies/ μ L。

1.4.2 感染实验 WSSV 感染实验前将对虾停食 1 天。使用无菌注射器向每尾对虾第 2 腹节肌肉中注射 20 μ L 的病毒悬液, 感染后各组继续投喂相对应的饲料。每天投喂时间为 7:00, 13:30, 22:00, 每天 9:00 换水, 换水量为 1/2, 根据实际情况进行日投喂量调整。感染 WSSV 期间及时捞出死亡对虾并记录, 避免对虾残食现象。8 天后结束感染实验, 根据对虾累计存活时间统计存活率及相对免疫保护率(relative percent survival, RPS)^[6]。

存活率=存活对虾数/初始对虾数×100%

$RPS=(\text{对照组死亡率}-\text{实验组死亡率})/\text{对照组死亡率}\times 100\%$

1.5 样品采集与处理

WSSV 感染实验开始后, 于 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 从各 PHB 浓度梯度的取样重复组中随机取虾 3 尾, 自对虾的头胸甲后插入围心腔取血淋巴液, 加入等体积 EDTA 抗凝剂置于离心管中, 4℃, 8 000 r/min, 离心 10 min, 取沉淀提取 RNA。

1.6 RNA 提取及 cDNA 合成

RNA 提取采用 Trizol 法, 具体参考郭艳的方法^[18]。cDNA 合成使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒进行。

1.7 DNA 提取及 WSSV 含量测定

取对虾肌肉组织提取 DNA, 提取方法参照王伟继^[19]的醋酸铵法。DNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 要求不含大量蛋白质及降解的 DNA 片段。使用超微量紫外分光光度计(Biodropsis Bo-2000)测定 DNA 含量及吸光度比值(要求在 OD_{260 nm}/OD_{280 nm}=1.8~2.0), 在确保 DNA 质量的情况下, 将溶液稀释至 20 ng/μL, -80℃保存用于 WSSV 含量检测。

1.8 基因相对表达量测定

超氧化物歧化酶基因(*sod*), 溶菌酶基因(*lzm*)和谷胱甘肽过氧化物酶基因(*gsh-px*)引物设计参照刘群芳等^[20]的方法, 抗菌肽基因(*abp*)引物设计参照李海兵^[21], 过氧化物酶基因(*cat*)引物序列根据 NCBI CAT cDNA 序列设计, 18S 引物序列设计参照逢锦菲^[22], 所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成, 引物序列见表 1。反应程序参照

SYBR® Premix Ex Taq™ II(TaKaRa)试剂盒说明进行。所有实验进行 3 个平行。结果使用 2^{-ΔΔC_t} 法进行处理, 使用 SPSS 18.0 软件的 *t* 检验进行显著性分析。

1.9 数据处理

数据使用 SPSS 18.0、Origin 9.0 处理, 数据均以平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示, 显著性差异水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 WSSV 感染后凡纳滨对虾的存活时间

A~F 组各组平均存活时间分别为(79.00±6.81) h, (86.38±5.90) h, (95.19±5.50) h, (89.98±5.92) h, (80.98±6.05) h 和(85.47±5.69) h, 随 PHB 浓度增加呈现上升后下降再上升的趋势(图 1)。饲喂 PHB 的对虾感染 WSSV 后平均存活时间均高于对照组。其中 1.0% PHB 实验组对虾平均存活时间在各组中最高, 显著高于对照组和 5% PHB 浓度组(*P*<0.05), 与 0.5%、2.5%和 10.0% PHB 浓度组无显著差异(*P*>0.05)。

2.2 WSSV 感染后凡纳滨对虾的存活率及免疫保护率

各组对虾经 20 d 饲养后感染 WSSV, 感染期间

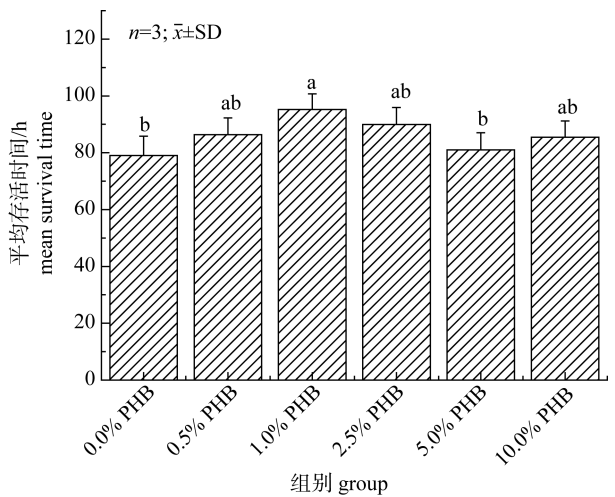


图 1 饲喂不同浓度 PHB 饲料的凡纳滨对虾感染 WSSV 后平均存活时间
标注不同字母表示差异显著(*P*<0.05)。

Fig. 1 Mean survival time of *Litopenaeus vannamei* fed with different PHB concentration after WSSV infection
Different letters denote significant difference between groups(*P*<0.05).

表 1 相对定量 PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences in relative quantification PCR	
引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')
18s-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18s-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
sod-F	TGCCACCTCTCAAGTATGATTTC
sod-R	TCCAACCAACTTCTTCGTAGCG
gsh-px-F	AAGATGTTTATGTTTCGGCAAAG
gsh-px-R	GCAGACAGGTGTCCAAATGAT
lzm-F	TATTCTGCCTGGGTGGCTTAC
lzm-R	CTAGAACATAGAGCTCGAAGTGGTC
cat-F	TCAAGTGGCGATTACCCCTC
cat-R	TCTGCTCCACCTCAGCAAAG
abp-F	GTTGACGGAGAACACGAT
abp-R	TTCCACAAGCCAGAGTAAG

除 1.0% PHB 浓度组有对虾存活外, 其余各组累计死亡率达到 100%。感染初期的前 24 h 内, 当 PHB 浓度不高于 2.5%时, 经 PHB 饲喂的对虾组存活率均高于对照组; 随感染实验的进行, 1.0% PHB 实验组对虾存活率在各时间点的存活率要高于其余实验组。在高浓度 5.0%及 10.0%浓度组中, 其存活率在 24 h 内低于对照组, 随后两高浓度组存活率表现出不同: 5.0% PHB 浓度组存活率一直下降且一直低于对照组及各个实验组; 对比 10.0% PHB 浓度组与对照组对虾存活率, 发现其仅在 96 h 低于对照组, 但两组之间无显著差别

($P>0.05$)。实验中还发现, 5%和 10% PHB 浓度组对虾在实验后期死亡速度下降(表 2, 表 3)。

不同浓度 PHB 对对虾感染 WSSV 后的 RPS 效应不同。低浓度 PHB 组中对虾 RPS 随着感染时间的延长下降, 到一定时间 RPS 趋近于 0。在 5.0%和 10.0% PHB 实验组中, RPS 随感染时间延长反而有上升趋势。

2.3 PHB 对凡纳滨对虾体内病毒含量的影响

分析不同时间段内凡纳滨对虾体内的平均病毒含量, 发现各组病毒含量变化趋势不同(图 2)。空白对照组病毒含量维持在 2.5×10^6 copies/ng

表 2 同一时间点不同 PHB 水平添加组凡纳滨对虾的存活率
Tab. 2 Survival rate of *Litopenaeus vannamei* fed PHB of different concentration at the same time point

时间/h time	组别 group					
	A(0.0%)	B(0.5%)	C(1.0%)	D(2.5%)	E(5.0%)	F(10.0%)
0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
24	87.5±3.54	85.0±7.07	87.5±3.54	92.5±10.61	72.5±10.61	82.5±17.68
48	57.5±3.54	62.5±10.61	72.5±3.54	60±7.07	52.5±10.61	67.5±10.61
72	40±7.07	45±7.07	57.5±3.54	47.5±10.61	30±21.21	40±21.21
96	25±7.07	30±7.07	32.5±3.54	30±14.14	17.5±10.61	22.5±3.54
120	15±7.07	17.5±3.54	20±0	10±7.07	7.5±10.61	15±7.07
144	5±0	5±0	12.5±3.54	5±7.07	2.5±3.54	7.5±3.54
168	0±0	0±0	5±0	0±0	0±0	2.5±3.54
192	0±0	0±0	2.5±3.54	0±0	0±0	0±0

注: A 为空白对照组, 即投喂不含 PHB 的饲料; B、C、D、E、F 为实验组, 依次为投喂 PHB 添加量为 0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0% 的饲料。

Note: A represents control group, supplemented with no PHB in feed; B, C, D, E, F represent experiment groups, supplemented with 1.0%, 2.5%, 5.0% and 10.0% of PHB in feed successively.

表 3 同一时间点不同 PHB 水平添加组免疫保护率(RPS)
Tab. 3 Relative percent survival (RPS) in different PHB concentration at the same time point

时间/h time	组别 group						%
	A(0.0%)	B(0.5%)	C(1.0%)	D(2.5%)	E(5.0%)	F(10.0%)	
24	0.00	-20.00	0.00	40.00	-120.00	-40.00	
48	0.00	11.76	35.29	5.88	-11.76	35.29	
72	0.00	8.33	29.17	12.50	-16.67	0.00	
96	0.00	6.67	10.00	6.67	-10.00	-3.33	
120	0.00	2.94	5.88	-5.88	-8.82	0.00	
144	0.00	0.00	7.89	0.00	-2.63	2.63	
168	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	2.50	
192	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	

注: A 为空白对照组, 即投喂不含 PHB 的饲料; B、C、D、E、F 为实验组, 依次为投喂 PHB 添加量为 0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0% 的饲料。

Note: A is control group, supplemented with no PHB in feed; B, C, D, E, F represent experiment groups, supplemented with 1.0%, 2.5%, 5.0% and 10.0% of PHB in feed successively.

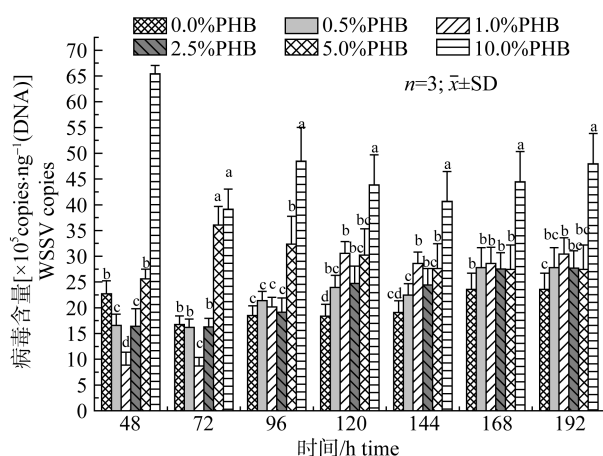


图2 不同 PHB 添加水平对感染 WSSV 的凡纳滨对虾体内病毒含量的影响

各时间点不同浓度组间具有不同字母上标表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig.2 Effects of PHB on the quantity of WSSV in *Litopenaeus vannamei* after WSSV infection

The columns with different letters are significantly different at the same time ($P<0.05$).

DNA, 0.5%、1.0%、2.5% PHB 实验组的病毒含量随时间延长呈现上升趋势, 且病毒含量显著低于对照组 ($P<0.05$), 1.0% PHB 实验组对虾体内病毒含量最低。5.0% PHB 浓度组对虾体内病毒含量在 48 h 内与对照组无显著差异, 随 WSSV 感染时间延长, 含量上升后又下降至稳定水平, 维持在 2.91×10^6 copies/ng DNA。饲喂 10.0% PHB 的对虾体内病毒含量在 48 h 达到最高值后下降, 除 72 h 外, 其病毒含量在其余时间点显著高于其他实验组 ($P<0.05$)。

2.4 PHB 对感染 WSSV 的凡纳滨对虾血淋巴非特异免疫基因的影响

对比 1.0% PHB 实验组及空白对照组基因表达水平, 发现经 PHB 投喂后对虾体内免疫基因表达水平均高于对照组。

sod、*cat* 和 *gsh-px* 3 个基因表达趋势在实验组与对照组间无差异(图 3A、B、C), 且均呈现先上升后下降再上升的趋势。*sod* 和 *cat* 表达量在 6 h 达到最高, 在 24 h 回复到最初水平。*gsh-px* mRNA 在 3 h 达到最高, 12 h 降至最低, 随后又开始上升。*lzm* 基因表达趋势在实验组与对照组间不完全一致(图 3, D), 两者基因表达量在第 6 小时达

到最高, 实验组对虾 *lzm* 表达量在 6 h 后维持恒定水平, 对照组 *lzm* 表达量在 6 h 后略微下调然后维持恒定水平。对虾在感染 WSSV 后血细胞内 *abp* mRNA 在 3 h 内急速下降, 之后上升并在 12 h 达到最高值后又下降, 但各取样时间点的表达水平均低于初始水平。

3 讨论

WSSV 具有很高的侵染性和复制能力, 具有传播快、流行面广、死亡率高、防治困难等特点, 感染 WSSV 后一般 3~10 d 养殖池中对虾死亡率便可近 100%^[23]。李旭鹏等^[24]研究发现对虾感染 WSSV 后的存活率与饵料的营养成分及其组成相关, 另外也有研究表明, 细菌及海藻提取物具有抗病毒及抗菌活性^[25], 在养殖水体中加入 PHB 颗粒或者积累 PHB 的细菌, 可保护感染发光弧菌(*Vibrio campbellii*)的卤虫(*Artemia franciscana*)^[26-27]。本研究将 PHB 混合于基础饲料中制粒, 减少了 PHB 的挥发及结块现象。

凡纳滨对虾属于无脊椎动物, 一般认为无脊椎动物无免疫记忆反应, 主要是由于无脊椎动物缺少特异性免疫球蛋白、T 细胞受体等^[28]。Fearon^[29]发现了先天性免疫对获得性免疫具有指导作用, 将先天性免疫提升到了一个重要地位。研究发现, 在对虾感染 WSSV 后多种先天免疫系统发挥作用^[30]。SOD、CAT 和 GSH-PX 属于免疫系统中的抗氧化酶系统, 能够清除机体内过多的活性氧(ROS), 反映机体氧化程度。WSSV 感染后 *sod*、*cat*、*gsh-px* 呈现先上调后下降表达, 可能是由于 WSSV 感染造成体内产生的 ROS(活性氧)增多, 反馈调节抗氧化酶系统基因表达量上升。这一观点与 Zhang 等^[31]的研究相似, 其发现中国明对虾在 WSSV 刺激后 3 h, 血细胞线粒体 *MnSOD* 表达量上调。目前, ROS 已经被证明可以调节病毒的复制^[32-33]。ABP 受病原体刺激及外界环境的诱导表达, 其在甲壳动物细菌、真菌及病毒的防御中具有重要作用。LZM 是非特异性体液免疫因子之一, 其在抵抗 WSSV 的过程中有重要作用^[34]。孙艳等^[7]发现感染 WSSV 的凡纳滨对虾经芽孢杆菌和溶藻弧菌饲

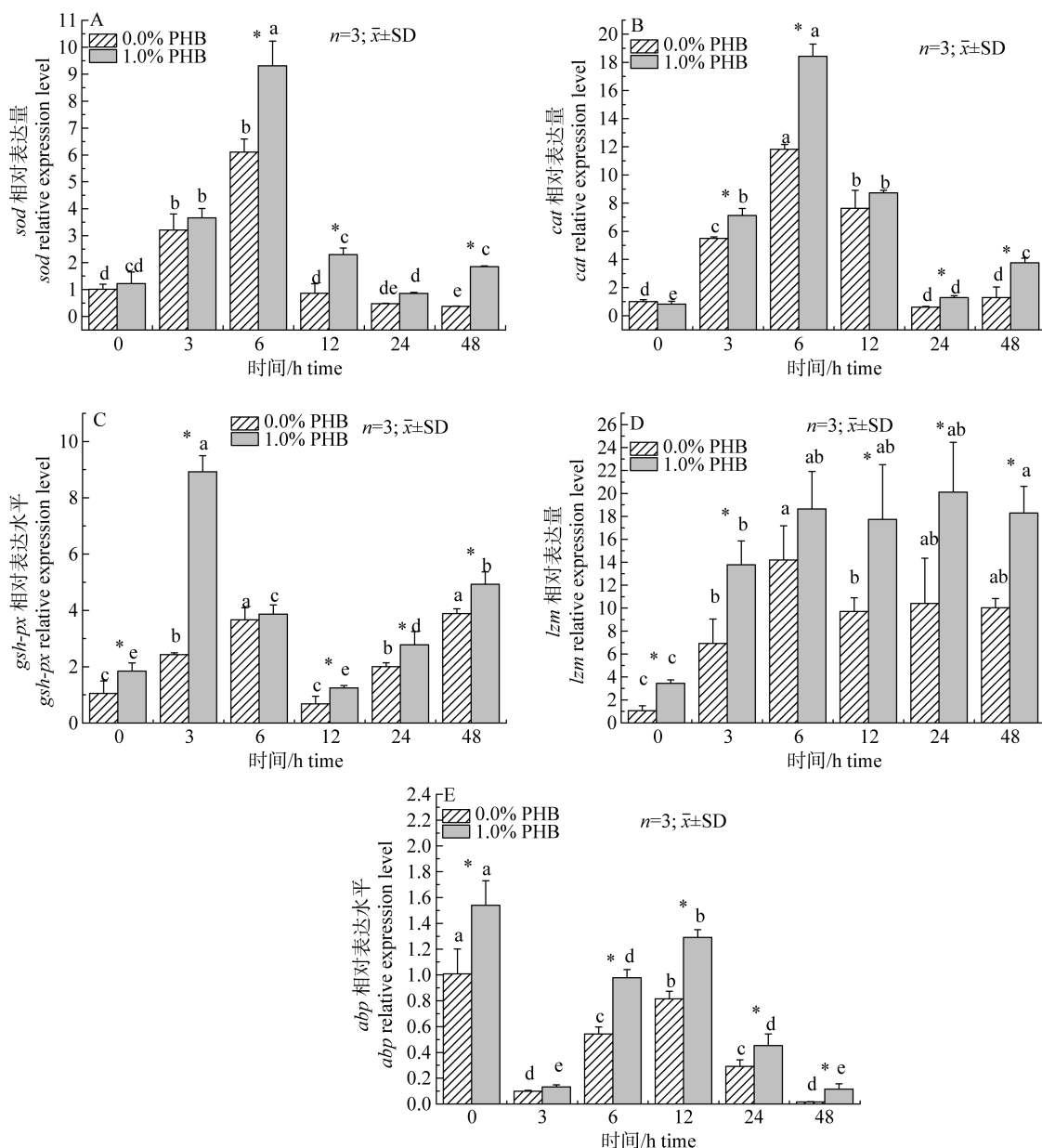


图 3 WSSV 感染期间对虾血淋巴中免疫相关基因相对表达量

A、B、C、D、E 分别表示基因 *sod*、*cat*、*gsh-px*、*lzm* 和 *abp* 相对表达水平; 同组中不同上标字母表示差异显著 ($P < 0.05$), *表示同一时间不同组差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.3 Relative expression of immune genes in the hemolymph of *Litopenaeus vannamei* during WSSV infection

A, B, C, D and E represent the gene expression level of *sod*, *cat*, *gsh-px*, *lzm* and *abp*. The columns with different letters under equal PHB concentration are significantly different ($P < 0.05$). * means significant difference between different PHB concentration groups at the same time ($P < 0.05$).

喂, 提高了对虾抗 WSSV 能力, 其血淋巴中 *sod*、*lzm* mRNA 表达量显著上调。本实验发现经 20 d 饲喂 PHB 后, 1.0%PHB 浓度饲喂的对虾血淋巴 *gsh-px*、*lzm*、*abp* 基因的表达水平高于未饲喂 PHB 的对虾, 且饲喂 1.0%PHB 浓度的对虾在感染

WSSV 后免疫基因表达水平一直较高(图 3)。因此推测一定浓度的 PHB 能刺激免疫基因表达。

实验中发现 PHB 虽对感染 WSSV 的对虾存活率无显著影响 ($P > 0.05$), 但能延长对虾的存活时间(图 1)。经 PHB 饲喂后对虾的平均存活时间均

高于对照组, 且 1.0% PHB 浓度组存活时间显著高于对照组($P<0.05$)。对比不同 PHB 含量组对虾的平均存活时间, 发现 PHB 的高浓度组(5.0%和 10.0%)对虾存活时间反而低于较低 PHB 浓度组(1.0%)的平均存活时间, 说明高浓度 PHB 对对虾存活有抑制作用, 造成以上现象的原因可能是对虾发生了酮体中毒。该结果与一些研究结果类似。Weltzien 等^[35]发现卤虫无节幼体可以利用 PHB 作为生长原料, 但水体中过高的 PHB 浓度引起酮酸代谢过多, 导致幼体死亡率上升。这与 PHB 在中国明对虾抗 WSSV 感染的研究结果一致^[36]。

WSSV 检测方法以病理学检测及生物诊断法为主, 本实验采用实时荧光定量 PCR 方法对死亡对虾病毒含量进行检测且灵敏度极高。结果发现低浓度 PHB 组(1.0%)对虾病毒复制在前期受到抑制, 病毒含量显著低于其余实验组($P<0.05$)。随时间进行, 低浓度 PHB 组对虾的病毒含量上升, 而高浓度组尤其是 10.0% PHB 浓度组的病毒含量则随着感染时间延长病毒含量反而下降。实验前期低浓度 PHB 组病毒含量较低的原因可能有两个: (1) PHB 提高了对虾免疫基因表达水平(图 3)进而提高了机体免疫力, 刘玉等^[37]研究发现在饲料中添加 PHB 能够提高中华绒螯非特异性免疫力; (2) 低浓度范围内 PHB 降低了对虾机体内的 pH, 使益生菌革兰氏阳性细菌在肠道中形成优势菌群^[38-39], 发挥抗病毒作用。益生菌抗病毒作用主要通过干扰病毒周期、竞争抑制作用阻止病毒复制、促进细胞自动调节间接感染病毒导致的病理过程等来实现^[40], 研究发现益生菌能够增强鱼体对抗彩虹病毒的能力^[41-42], 以上两者共同作用抑制病毒复制。而高浓度 PHB 组前期因发生酮体中毒现象, 免疫系统反而受到抑制, 造成体内病毒含量较高。但是在实验后期, 随 WSSV 感染时间延长, 对虾活力下降、摄食减少, 低浓度组中 PHB 未达到保护作用的初始浓度, 病毒大量复制, 体内病毒含量上升, 而高浓度 PHB 组的对虾摄取 PHB 量减少, 酮体中毒现象缓解, 病毒复制得到抑制。另外发现, 在实验后期经 PHB 饲喂的对虾体内病毒含量均高于对照组, 说明在后期 PHB 主要作用在

于提升对虾对 WSSV 的耐受力。这与董世瑞等^[43]研究结果一致, 其发现选取合适饵料可以增强中国对虾 WSSV 的耐受力。

综上所述, PHB 能增强对虾抗 WSSV 的能力, 可作为候选疫苗增强剂, 且其最适添加剂量为 1.0%。

参考文献:

- [1] Wang X Q, Ma S, Dong S L. Studies on the biology and cultural ecology of *litopenaeus vannamei*: A review[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2004(4): 94-100.[王兴强, 马甦, 董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 海洋湖沼通报, 2004(4): 94-100.]
- [2] Tang X C. The influence of temperature on *Penaeus vannamei*[J]. Marine Sciences, 2003, 27(10): 79-80.[唐啸尘. 温度对南美白对虾的影响[J]. 海洋科学, 2003, 27(10): 79-80.]
- [3] Perez-Velazquez M L, Gonzalea-Felix M, Jaimes Bustamente F, et al. Investigation of the effects of salinity and dietary protein level on growth and survival of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. J World Aquacult Soc, 2007, 38(4): 475-485.
- [4] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16(3): 321-334.
- [5] Cheng W, Chen J, Chen S, et al. Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae*[J]. Aquaculture, 2003, 219(1): 111-121.
- [6] Yan D W, Hua X M, Zhou H Q. Effects of chitosan on the growth and disease-resistant in grass carp[J]. Feed Industry, 2007, 28(12): 17-18.[闫大伟, 华雪铭, 周洪琪. 壳聚糖对草鱼的生长及抗病性能的影响[J]. 饲料工业, 2007, 28(12): 17-18.]
- [7] Sun Y, Liu F, Song X L, et al. Effects of adding probiotics in the feed on non-specific immune gene expression and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 945-951.[孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异免疫基因表达量和抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 945-951.]
- [8] Song L P, Huang X X, Zhou H Q. The effect of Vc, beta-glucan and algae powder on growth, survival rate and immune enzyme activities of *Penaeus chinensis* juvenile[J].

- Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(3): 276–281.[宋理平, 黄旭雄, 周洪琪, 等. Vc、葡聚糖和藻粉对中国对虾幼虾生长、成活率及免疫酶活性的影响[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(3): 276–281.]
- [9] Guo W T, Li J. Effect of chinese herbal medicine on growth and immune factors of haemolymph for *Litopenaeus vannamei*[J]. Feed Industry, 2005, 26(6): 6–9.[郭文婷, 李建. 中草药制剂对凡纳滨对虾生长及血淋巴中免疫因子的影响[J]. 饲料工业, 2005, 26(6): 6–9.]
- [10] Wang G Q, Niu X T, Lu H M, et al. Effects on the immunity and disease-resistance by adding different concentration of vitamin E and DHA[J]. Chinese Journal of Animal Sciences, 2012(3): 52–55.[王桂芹, 牛小天, 芦洪梅, 等. 不同维生素 E 和 DHA 水平对建鲤免疫力和抗病力的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2012(3): 52–55.]
- [11] Liu Y, Wang X L, Lv Q, et al. Effects of mannuronate polysaccharide on enzymes of *Penaeus Chinensis* related with immune and hemolysis[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(6): 549–553.[刘岩, 汪晓路, 吕青, 等. 聚甘露糖醛酸对中国对虾免疫相关酶活性和溶菌溶血活性的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(6): 549–553.]
- [12] Campa-Córdova A I, Hernández-Saavedra N Y, De Philippis R, et al. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12(4): 353–366.
- [13] Matthew A G, Franklin M A, Upchurch W G. Effect of weaning on ideal short-chain fatty acid concentrations in pigs[J]. Nutr Res, 1996, 16(10): 1689–1698.
- [14] Antongiovanni M, Buccioni A, Petacchi F, et al. Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition[J]. Ital J Anim Sci, 2007, 6(1): 19–25.
- [15] De Schryver P, Sinha A K, Kunwar P S, et al. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(5): 1535–1541.
- [16] Sun C B, He J G, Li Z L, et al. Sensitivity difference to WSSV of *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2006, 26(3): 17–20.[孙成波, 何建国, 黎子兰, 等. 凡纳滨对虾和斑节对虾对 WSSV 敏感性的比较[J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(3): 17–20.]
- [17] Durand S V, Lightner D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp[J]. J Fish Dis, 2002, 25(7): 381–389.
- [18] Guo Y. The expression and clinical significance of Survivin, hTERT and STK15 in laryngeal squamous cell carcinoma[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2009.[郭艳. Survivin、hTERT 及 STK15 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义[D]. 天津: 天津医科大学, 2009.]
- [19] Wang W J. Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers and commercial traits QTL mapping[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007.[王伟继. 中国对虾 AFLP 分子标记连锁图谱的构架以及相关性状 QTL 定位分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.]
- [20] Liu Q F, Cao J M, Huang Y H, et al. The combined effects of β -glucan with selenium and vitamin E on the growth performance, serum immune and antioxidant indexes, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(5): 997–1006.[刘群芳, 曹俊明, 黄燕华, 等. β -葡聚糖与硒、维生素 E 联合添加对凡纳滨对虾生长、血清免疫和抗氧化指标及抗病力的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(5): 997–1006.]
- [21] Li H B. Probiotic bacteria isolated from intestinal of shrimps and establishment of evaluable index of immune substances[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.[李海兵. 对虾肠道益生菌的筛选与免疫物质活性评价指标的建立[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.]
- [22] Pang J F. High-throughout screening of SNP and its association with WSSV-resistance traits in *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai NO.2”[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.[逢锦菲. “黄海 2 号”中国对虾高通量 SNP 筛选及其与抗 WSSV 性状的关联分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [23] Lighiner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured Penaeid shrimp[M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996.
- [24] Li X P, Meng X H, Kong J, et al. Effects on survival time of *Fenneropenaeus chinensis* challenged by different doses of WSSV and diets[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(2): 263–268.[李旭鹏, 孟宪红, 孔杰, 等. WSSV 人工感染量和饵料对中国明对虾存活时间的影响. 水产学报, 2013, 37(2): 263–268.]
- [25] Li G Y, Song X L, Sun Y, et al. Effects of probiotics from the shrimp intestine on the non-specific immunity and antiviral capacity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(6): 1359–1367.[李桂英, 宋晓玲, 孙艳, 等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1359–1367.]
- [26] Defoirdt T, Halet D, Vervaeren H, et al. The bacterial storage

- compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*[J]. Environ Microbiol, 2007, 9(2): 445–452.
- [27] Halet D, Defoirdt T, Van Damme P, et al. Poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2007, 60(3): 363–369.
- [28] Kurtz J, Franz K. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity[J]. Nature, 2003, 425(6953): 37–38.
- [29] Fearon Dt L R. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response[J]. Science, 1996, 272(5258): 50–53.
- [30] Li S, Zhang X, Sun Z, et al. Transcriptome analysis on Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during WSSV acute infection[J]. PloS One, 2013, 8(3): e58627.
- [31] Zhang Q, Li F, Wang B, et al. The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: cloning, distribution and expression[J]. Dev Comp Immunol, 2007, 31(5): 429–440.
- [32] Perl A, Banki K. Genetic and metabolic control of the mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate production in HIV disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2000, 2(3): 551–573.
- [33] Gong G, Waris G, Tanveer R, et al. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(17): 9599–9604.
- [34] Rojtinnakorn J, Hirano I, Itami T, et al. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 13(1): 69–83.
- [35] Weltzien F A, Hemre G I, Evjemo J O, et al. Beta-Hydroxybutyrate in developing nauplii of brine shrimp (*Artemia franciscana* K.) under feeding and non-feeding conditions[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2000, 125(1): 63–69.
- [36] Deng K Y, Kong J, Meng X H, et al. Effects of poly- β -hydroxybutyrate on WSSV resistance in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(8): 1167–1174.[邓康裕, 孔杰, 孟宪红, 等. 聚 β -羟基丁酸酯对中国明对虾抗 WSSV 能力的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(8): 1167–1174.]
- [37] Liu Y, Sui L Y, Deng Y G, et al. Effect of poly- β -hydroxybutyrate on growth and hepatopancreatic enzyme activities of *Eriocheir Sinensis Juveniles*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(5): 1333–1338.[刘玉, 隋丽英, 邓元告, 等. 聚 β -羟基丁酸酯(PHB)对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)幼蟹生长和肝胰腺酶活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1333–1338.]
- [38] Clarke J M, Bird A R, Topping D L, et al. Excretion of starch and esterified short-chain fatty acids by ileostomy subjects after the ingestion of acylated starches[J]. Am J Clin Nutr, 2007, 86(4): 1146–1151.
- [39] Baruah K, Norouzitalab P, Debnath D, et al. Organic acids as non-antibiotic nutraceuticals in fish and prawn feed[J]. Aquacult Intl, 2008, 12: 4–6.
- [40] Gao Q X, Shi Z H, Peng S M. Probiotics in aquaculture: recent progress and outlook[J]. Marine Fisheries, 2013, 35(2): 364–371.[高权新, 施兆鸿, 彭士明. 益生菌在水产养殖中的研究进展[J]. 海洋渔业, 2013, 35(3): 364–371.]
- [41] Son V M, Chang C C, Wu M C, et al. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(5): 691–698.
- [42] Liu C, Chiu C, Wang S, et al. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33(4): 699–706.
- [43] Dong S R, Gao H, Kong J, et al. Effects of diets on growth of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and survival rate from WSSV[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 52–56.[董世瑞, 高焕, 孔杰, 等. 不同饵料对中国对虾幼虾生长及感染 WSSV 存活率的影响[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 52–56.]

Effects of poly- β -hydroxybutyrate on non-specific immune gene expression and WSSV resistance in WSSV-infected *Litopenaeus vannamei*

DENG Kangyu^{1,2}, KONG Jie², MENG Xianhong², LUO Kun², LUAN Sheng², CAO Baoxiang², LIU Ning²

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: White spot syndrome (WSS), an epizootic disease, has been prevalent in cultured shrimp in China since 1992 and results in high mortality. The economic loss caused by white spot syndrome virus (WSSV) is extensive and has been harmful to shrimp aquaculture worldwide. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is a polymer of the short-chain fatty acid β -hydroxybutyrate. β -hydroxybutyric acid can promote food digestion, nutrient absorption, and protein and mineral utilization. This study was conducted to investigate the anti-WSSV effects of PHB on and relative expression of non-specific immune genes in WSSV-infected *Litopenaeus vannamei*. *Litopenaeus vannamei* were supplied with 0.0% (control group), 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5.0%, or 10.0% PHB in artificial compound feed at a daily ration of 5.0% body weight. After WSSV challenge, survival rates, mean survival time, relative percent survival (RPS), and number of WSSV copies were compared. The relative expression of the genes that encode superoxide dismutase (*sod*), catalase (*cat*), glutathione peroxidase (*gsh-px*), lysozymes (*lzm*), and antibacterial peptides (*abp*) in *L. vannamei* were analyzed by quantitative real-time reverse transcription PCR. The results showed that there was no difference in survival rates among different treatments ($P>0.05$); nevertheless, the mean survival time of PHB-fed shrimp was higher than that of the control group. The mean survival time of 1.0% PHB-fed shrimp was the highest, and it was significantly higher than that of the control and 5.0% PHB-fed shrimp ($P<0.05$). The number of WSSV copies in the experimental individuals fed with 0.5%, 1.0% and 2.5% PHB were lower than the control group ($P<0.05$). Moreover, *sod*, *cat*, *gsh-px*, *lzm*, and *abp* expression levels in 1.0% PHB were higher than that in the control group. The expression level of *sod*, *cat*, *gsh-px*, and *lzm* reached the acme at 6 h, 6 h, 3 h, and 6 h, respectively. After WSSV infection, *abp* dropped rapidly within 3 h and then steadily decreased after reaching the acme at 12 h. In addition, the gene expression levels of PHB-fed shrimps were higher than the control group. Consequently, PHB can help improve immunity and treat WSSV infections.

Key words: poly- β -hydroxybutyrate; WSSV; challenge test; real-time PCR; non-special immunity; *Litopenaeus vannamei*

Corresponding author: MENG Xianhong. E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn