

文章编号: 1674 - 5566(2012)06 - 1003 - 08

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

王武刚, 罗词兴, 黄旭雄, 郭腾飞, 冯隆峰

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 以鱼粉含量为 25% 的饲料为对照组, 分别用酵母提取物替代配方中 15%、30%、45% 和 60% 鱼粉, 配制 5 组等氮、等能饲料投喂凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) (7.50 ± 0.13) g 42 d, 研究酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾血清免疫酶及鳃组织中溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 相对表达量的影响, 并进行溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 人工急性感染试验。结果表明: 15% 组血清溶菌酶 (LSZ) 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其余替代组与对照组无显著差异。酵母提取物部分替代鱼粉对凡纳滨对虾血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和鳃组织中溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 的相对表达量影响均不显著 ($P > 0.05$); 经溶藻弧菌人工急性感染后, 24 h 和 48 h 时 60% 组累计死亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其余各替代组与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 72 h 和 96 h 时各替代组与对照组差异均不显著 ($P > 0.05$)。表明以酵母提取物替代凡纳滨对虾饲料中 45% 的鱼粉不会显著降低凡纳滨对虾的免疫抗菌能力。

研究亮点: 新型饲料蛋白原替代鱼粉是营养饲料学研究的热点。本研究以可再生的酵母细胞提取物部分替代鱼粉, 研究蛋白替代对凡纳滨对虾免疫抗菌机能及溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 表达的影响。发现适量替代不会对凡纳滨对虾的免疫抗病机能产生显著负面影响。

关键词: 凡纳滨对虾; 酵母提取物; 溶菌酶; 超氧化物歧化酶; 溶菌酶 mRNA; Toll 受体 mRNA

中图分类号: S 963.71

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 又名南美白对虾, 具有生长迅速、抗病力强等优点, 是我国主要的对虾养殖品种之一, 2010 年全国养殖凡纳滨对虾的产量约 120 万吨^[1]。鱼粉是生产对虾配合饲料的主要蛋白源之一, 鱼粉资源的紧缺及价格的高涨, 严重影响了对虾的养殖效益和对虾养殖产业的可持续发展^[2-3]。寻找其他廉价、高效、可再生的饲料蛋白原料来部分或全部替代鱼粉是当前水产动物营养与饲料研究的热点。目前肉骨粉^[4]等动物蛋白源和豆粕^[5]、棉粕^[6]、菜粕^[7]等植物蛋白源在水产饲料中已大量应用。近年来, 酵母细胞等微生物蛋白源因其营养丰富、蛋白质含量高、可工业化生产且生产速率高等特点, 得到了广泛的应用^[8-11]。在鱼粉替代研究中, 不仅要考虑水产动物的生长性能和对

饲料的利用性能, 还要考虑替代后对养殖动物的免疫机能和抗病能力的影响。有研究发现当用豆粕替代大西洋鲑 (*Salmo salar*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 饲料中鱼粉时可造成机体非特异性免疫力下降^[12]。用菜粕替代鱼粉可降低凡纳滨对虾成活率^[13]。

近年来水产养殖集约化程度和养殖密度的增加使病害成为制约养殖业进一步发展的重要因素。随着人们对环境保护及食品安全的关注度的提高, 传统的依靠频繁使用抗生素等药物的病害防治模式逐渐被摒弃^[14-16], 疫苗的高成本及对病原的专一性也限制了其应用^[17-18], 而通过营养途径改善养殖动物免疫机能从而达到疾病防控越来越受到重视。虾类的免疫系统和机理已有广泛的研究^[19-21]。对虾等甲壳类不具备

收稿日期: 2012-04-13 修回日期: 2012-06-03

基金项目: 上海市科学技术委员会项目(08DZ1981000); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 王武刚(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饵料科学。E-mail: 5wangwugang@163.com

通讯作者: 黄旭雄, E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

特异性免疫机能,仅具备非特异性免疫机能,溶菌酶(LSZ)和超氧化物歧化酶(SOD)活性是评价甲壳动物机体免疫机能的常用指标^[22]。对虾类的Toll受体是机体非特异性免疫的重要组成部分,在免疫应答中发挥重要作用,负责将异物入侵的信号从细胞外传递到细胞内并由此介导细胞产生一系列的免疫反应^[23-25],YANG等^[26]报导了凡纳滨对虾Toll受体基因的序列,发现凡纳滨对虾Toll受体在血细胞及鳃中的表达量最高。饲料中维生素水平和微量元素水平对凡纳滨对虾Toll受体的影响已有见报道^[27-28]。在前期的研究中,发现用酵母提取物替代饲料中45%鱼粉对凡纳滨对虾的生长性能无不良影响,但对其免疫机能的影响尚不知晓。本文研究了酵母提取物部分替代鱼粉对凡纳滨对虾血清LSZ和SOD活性、抗弧菌能力的影响,并检测了对虾溶菌酶基因和Toll受体基因的表达水平,旨在探讨酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾免疫抗菌机能的影响,以期为酵母提取物在凡纳滨对虾配合饲料中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验用虾

试验用凡纳滨对虾购自上海市临港新城某凡纳滨对虾养殖池塘,所用幼虾的初始体重为 (7.50 ± 0.13) g。

1.2 试验饲料配制

本试验用酵母提取物(Fit)由上海利鼎生物饲料有限公司提供,其主要营养成分见表1。

表1 酵母提取物的主要营养成分

营养物	含量	营养物	含量
干物质	91.00	异亮氨酸	2.17
粗蛋白	62.95	亮氨酸	5.24
总脂	0.9	赖氨酸	4.90
碳水化合物	10.70	蛋氨酸	0.47
丙氨酸	3.16	苯丙氨酸	2.75
精氨酸	3.79	脯氨酸	1.45
天冬氨酸	3.75	丝氨酸	2.59
胱氨酸	1.41	苏氨酸	2.39
谷氨酸	7.51	酪氨酸	1.20
甘氨酸	2.63	色氨酸	0.60
组氨酸	3.15	缬氨酸	3.90

试验饲料的其它主要原料购自上海农好饲

料有限公司。将饲料原料粉碎、过80目筛网备用,以含25%鱼粉组为对照,按等氮等能配制5种试验饲料(表2)。饲料的制作采用逐级扩大法将微量成分与其它饲料原料充分混合均匀,挤压制粒,干燥后4℃密封贮存备用。

表2 试验饲料组成及营养成分分析

Tab.2 Ingredients and proximate compositions of the experimental diets %

原料	对照组	15%组	30%组	45%组	60%组
大豆粕	15	15	15	15	15
菜籽粕	5	5	5	5	5
花生粕	10	10	10	10	10
鱼粉	25	21.25	17.5	13.75	10
酵母提取物	0	4	8.5	13	18
啤酒酵母	3	3	3	3	3
血粉	4	4	4	4	4
面粉	23.3	21.85	20.4	18.95	16.5
小麦麸	5	5	5	5	5
鱼油	0	0.2	0.4	0.6	0.8
大豆油	2	2	2	2	2
复合添加剂	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
磷酸二氢钙	0	1	1.5	2	3
营养成分					
粗蛋白	40.35	40.46	40.74	40.53	40.68
粗脂肪	7.23	7.34	6.98	6.28	6.07
灰分	10.08	10.52	10.69	10.77	11.50
蛋氨酸	1.69	1.73	1.76	1.71	1.71
赖氨酸	2.46	2.66	2.75	2.58	2.75
总氨基酸含量	39.45	39.86	39.55	39.18	39.99
总磷	0.75	0.85	0.86	0.83	0.95
总钙	0.97	1.12	1.08	0.94	0.69
总能/(MJ/Kg)	19.49	19.43	19.35	19.15	19.00

注:复合添加剂由上海海洋大学营养饲料研究室研制,含诱食剂、磷脂、蛋氨酸、虾用多维和多矿等成分;营养成分除总能为理论计算值外^[29],其余均为实测值。

1.3 饲养管理

所购虾先在在水泥池(5 m × 2 m × 1.2 m)暂养5 d,然后从中挑选规格整齐、活力好的虾随机分配到20个网箱(100 cm × 100 cm × 80 cm)中,每箱50尾。先用对照组饲料进行暂养,待虾适应并摄食正常后,分别投喂5种试验饲料,每个饲料组设置4个重复。试验从2011年8月13日至9月23日,共42 d。养殖用水为室外池塘养殖用水,养殖期间水温为23~27℃,连续充气保持溶解氧≥6.0 mg/L,养殖期间定期监测水质并换水,控制氨氮≤0.4 mg/L,pH为8.0~8.5。每天投喂4次(06:00、10:00、15:00、20:00),投喂量为其体重的3%~5%左右。5天换水一次,换水

量为水体的 1/3 左右。

1.4 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 人工急性感染试验

养殖试验结束后,从各网箱中分别挑取处于蜕皮间期的对虾 20 尾,每尾虾从尾部腹肌分别注射溶藻弧菌菌液 30 μL ,注射浓度为 $4.0 \times 10^6/\text{mL}$ 。以注射 30 μL 无菌生理盐水组为阴性对照,阴性对照组对虾采用对照组的虾,注射后分别暂养在 20 个 120 L 的水族箱中,攻毒期间水温 21 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,人工注射弧菌之后连续观察并统计对虾死亡情况。

1.5 指标测定

养殖试验结束后饥饿 24 h,从每个网箱中随机取虾 15 尾,由心脏抽取血淋巴液,置于 1.5 mL 离心管中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 10 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液即血清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于测定 LSZ 和 SOD 活性。LSZ 活性测定采用自身比浊法^[30]进行,SOD 活性测定采用南京建成生物工程研究所的 SOD 试剂盒进行。

同时从每个网箱中随机取 5 尾对虾,取其鳃组织置于液氮速冻后,转移至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于测定鳃组织中溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 表达情况。将 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的对虾鳃组织用 Trizol 按试剂盒 (TaKaRa) 说明书提取总 RNA,所提取的总 RNA 的 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 值为 1.9 ~ 2.0。按照 PrimeScriptR RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书将提出的总 RNA 反转录为 cDNA,再使用 SYBR Premix ExtaqTM (Perfect Real Time) 试剂盒进行荧光定量 PCR。PCR 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s,一个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,共 39 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 溶解曲线检测反应特异性。每个复孔以 β -actin 为参照基因。其中荧光定量引物参照凡纳滨对虾溶菌酶基因 (GenBank: AY170126. 2)、Toll 受体基因 (GenBank: DQ923424. 1) 和 β -actin (GenBank: AF300705) 设计。所有引物均有上海生工生物技术有限公司合成(表 3)。根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算法进行相对定量分析鳃组织中溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 的相对表达量。

1.6 数据分析

试验结果用平均数 \pm 标准差表示,使用 SPSS (17.0) 分析软件对数据进行单因子方差分析 (ONE-WAY ANOVA) 和 Duncan 多重检验, $P <$

0.05 为处理组之间差异显著。

表 3 凡纳滨对虾溶菌酶 mRNA、Toll 受体基因与 β -actin 参照基因引物序列

Tab. 3 Primer pairs for lysozyme, Toll receptor and β -actin genes for *L. vannamei*

引物	序列
β -actin-SQF	CGCGACCTCACAGACTACCT
β -actin-SQR	CTCGTAGGACTTCTCCAGCG
Lysozyme-SQF	GTTCCGATCTGATGTCCGATG
Lysozyme-SQR	AAGCCACCCAGGCCAGAATAG
Tollreceptor-SQF	TGAGAGATGCCCACTGCCTG
Tollreceptor-SQR	CGCTTGAAGTTTGTGAGGGAG

2 结果

2.1 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾血清 LSZ 活性的影响

图 1 所示为摄食不同饲料的凡纳滨对虾血清 LSZ 活性。15% 组 LSZ 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$),其余替代组与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

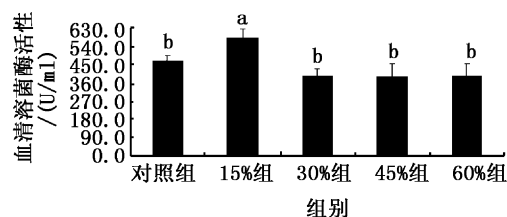


图 1 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾血清 LSZ 活性的影响

Fig. 1 Effect of replacement of fish meal with yeast extract on activities of serum lysozyme of *L. vannamei*

2.2 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾血清 SOD 活性的影响

图 2 所示为摄食不同饲料的凡纳滨对虾血清 SOD 活性。各替代组凡纳滨对虾的血清 SOD 活性均略高于对照组,其中 30% 组血清 SOD 酶活性最高,但酵母提取物替代饲料中的鱼粉对凡纳滨对虾血清 SOD 活性影响不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾鳃组织中溶菌酶 mRNA 表达的影响

由图 3 可知,15% 组凡纳滨对虾鳃组织中溶菌酶 mRNA 的相对表达量最高,对照组的相对表达量最低,但各替代组的相对表达量与对照组的相对表达量差异均不显著 ($P > 0.05$)。

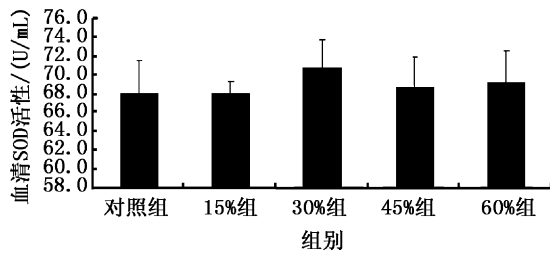


图2 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾血清SOD活性的影响

Fig. 2 Effect of replacement of fish meal by yeast extract on activities of serum superoxide dismutase of *L. vannamei*

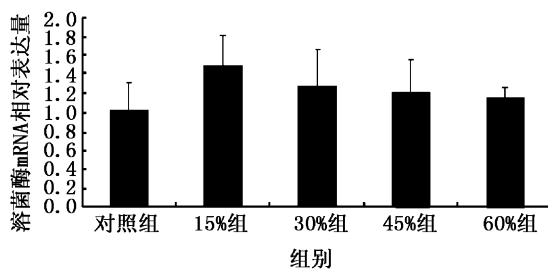


图3 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾鳃组织中溶菌酶 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effect of replacement of fish meal by yeast extract on relative expression of lysozyme mRNA in gill of *L. vannamei*

2.4 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 表达的影响

由图4可知各替代组凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 的相对表达量与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 其中 60% 组的相对表达量最高, 30% 组的相对表达量最低。

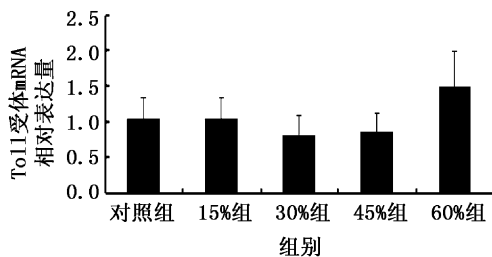


图4 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effect of replacement of fish meal by yeast extract on relatively expression of Toll receptor mRNA in gill of *L. vannamei*

2.5 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾抗弧菌能力的影响

图5表明,凡纳滨对虾受到溶藻弧菌人工感染 24 h 时,60% 组累计死亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其余各替代组与对照组差异不显著 ($P > 0.05$); 48 h 时,60% 组累计死亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其余各替代组与对照组差异不显著 ($P > 0.05$); 72 h 和 96 h 时各替代组与对照组差异均不显著 ($P > 0.05$)。

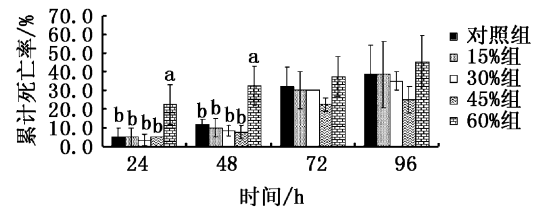


图5 酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾攻毒后累计死亡率的影响

Tab. 5 Effect of replacement of fish meal by yeast extract on cumulative mortality of *L. vannamei* after attacked with *V. alginolyticus*

3 讨论

溶菌酶能够水解细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4-糖苷键, 从而引起细菌裂解, 是水生动体内重要的非特异性免疫因子之一^[31]。溶菌酶, 广泛存在于甲壳动物体内多种组织和体液中, 水产动物的溶菌酶活性是衡量其机体免疫状态的重要指标之一^[32]。研究表明啤酒酵母可以提高鱼类的非特异性免疫力^[33-34]。但当饲料中使用过量的酵母蛋白源则会降低水产动物的免疫机能^[35]。崔敏等^[11]发现生物饲料酵母替代大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 饲料 (对照组含 65% 鱼粉) 中 17% 的鱼粉时血清溶菌酶活性最高, 继续增加饲料酵母的使用量, 血清溶菌酶活性反而降低, 说明高浓度的生物饲料酵母对血清溶菌酶的活性可能具有抑制作用。本试验中 15% 组血清溶菌酶活性显著高于对照组, 鱼粉替代量大于 15% 后, 各替代组血清溶菌酶活性均低于对照组。表明适量的酵母提取物可以提高凡纳滨对虾血清溶菌酶活性, 而过量的酵母提取物则会抑制对虾血清溶菌酶活性, 这可能与酵母提取物内所含的核苷酸有关。有研究表明核苷酸可提高

大西洋鲑的免疫力,增强其对各种致病性细菌的抗感染能力^[36]。SAJEEVAN 指出核苷酸可作为水产动物的免疫增强剂,但核苷酸在鱼类和甲壳类体内的合成及代谢机制尚不清楚^[37]。食物或饲料中过多的核酸会对人类和单胃动物产生毒性^[38],而在鱼类中却无此现象^[39],但也有一些研究者报道饲料中高含量的核酸会对鱼类产生有害的影响^[40-41]。

超氧化物歧化酶(SOD)是机体重要的抗氧化酶,能消除体内自由基,SOD 的活性反映了机体的抗氧化能力,当 SOD 活性降低时,生物体内会出现自由基过多,势必扰乱一些重要的生化过程,导致代谢紊乱和正常生理功能失调及免疫功能下降^[28]。因此,SOD 活性与生物体的免疫水平密切相关,对于增强吞噬细胞防御能力和改善机体的免疫功能有重要影响^[42]。影响水产动物抗氧化能力的因素很多,如饲料成分^[43]、生理状态^[44]和 pH、温度、重金属等外界条件^[45],SOD 活性的变化反应的不单是机体的免疫功能变化的指标,更是反映机体综合的生理学变化的指标^[21]。本试验中各试验组对虾血清 SOD 活性均略高于对照组,这与 FOURNIER 等^[46]对大菱鲆的研究结果相类似,而崔敏等^[11]研究却发现大菱鲆血清 SOD 活性随饲料中饲料酵母比例的增加而降低。表明蛋白替代后养殖动物血清 SOD 活性变化与水产动物的种类、酵母蛋白源的品质和实验条件等有关。

目前已从异育银鲫(*Carassius auratus*)^[47]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[48]、短沟对虾(*Penaeus semisulcatus*)和凡纳滨对虾^[49]等水产动物中克隆了溶菌酶基因。饥饿^[47]、细菌感染^[50]、免疫刺激物^[51]和蛋白源^[52]等均会影响水产动物溶菌酶基因 mRNA 表达。当用玉米蛋白粉替代暗纹东方鲀(*Fugu obscurus*)饲料中 14.8% 鱼粉时,其在肝胰脏、头肾和脾脏组织的 c-型溶菌酶 mRNA 相对表达量均达到最大值^[52]。本研究中酵母提取物替代鱼粉不会显著影响凡纳滨对虾鳃组织中溶菌酶基因 mRNA 表达量,可能与蛋白源及动物种类的不同有关。

Toll 受体是在 1980 年研究果蝇胚胎发育时发现的一种蛋白^[53],HASHIMOTO 等 1988 年首先报导了 Toll 基因的分离及其特性^[54]。在无脊椎动物中,当受到微生物入侵时,其机体借助

PGRP-SA 和 GNB-1 复合物与病原微生物上病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)结合后启动 Spatzle 蛋白,被活化的 Spatzle 蛋白与 Toll 受体结合,将异物入侵的信号从胞外传递到胞内,从而引起胞内信号级联反应^[23-25]。凡纳滨对虾 Toll 受体在血淋巴及鳃组织中的表达量较高^[26],在哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)感染之后凡纳滨对虾 Toll 受体的表达量升高^[55]。目前关于饲料中营养素水平对凡纳滨对虾 Toll 受体的影响已有见报道^[27-28]。冯伟等^[27]研究发现中国明对虾饲料中添加 2% Vc 能上调鳃组织中 Toll 样受体的表达量,表明适量的 Vc 能提高中国明对虾的免疫应答能力。饲料中的锌添加水平对凡纳滨对虾的 Toll 受体基因的表达有显著影响,相比摄食未添加锌组饲料和添加 150 mg/kg 组饲料,凡纳滨对虾的免疫抗菌功能在摄取添加 50 mg/kg(锌含量为 73.25 mg/kg 饲料)饲料时得到改善^[28]。本研究中,各替代组对虾 Toll 受体相对表达量与对照组差异不显著,表明酵母提取物替代鱼粉不会影响凡纳滨对虾细胞免疫反应中异物入侵信号的传递。

攻毒试验能直观的反映出凡纳滨对虾对特定病原的抵抗力。在对急性感染哈维弧菌的中国明对虾免疫机能研究中发现,对虾抗弧菌能力与肌肉 LSZ 活性正相关^[21],而本研究中血清 LSZ 活性变化与攻毒试验结果并不完全一致,推测可能与攻毒的剂量及 LSZ 活性的表征单位不同有关。本研究中血清溶菌酶活性的表征单位为 U/mL 血清,而文献中肌肉溶菌酶活性的表征单位为 U/mg。对虾的生理状态如蜕皮等会影响其血细胞密度和血淋巴液体积及血清的蛋白含量,继而导致血清 LSZ 活性随表征单位的不同而异。综上所述,用酵母提取物替代饲料中 15% 的鱼粉可显著提高凡纳滨对虾血清溶菌酶活性,但酵母提取物替代饲料鱼粉对凡纳滨对虾溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 表达无显著影响,用酵母提取物替代饲料中 45% 的鱼粉不会对凡纳滨对虾抗弧菌能力产生负面影响。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 23-62.
- [2] AMAYA E A, DAVIS D A, ROUSE D B. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions [J]. *Aquaculture*, 2007, 262 (2/4) : 393 - 401.
- [3] GATLIN III D M, BARROWS F T, BROWN P, et al. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review [J]. *Aquaculture Research*, 2007, 38 (6) : 551 - 579.
- [4] WATANABE T, PONGMANEERAT J, SATO S, et al. Replacement of fish meal by alternative protein sources in rainbow trout diets [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1993, 59 (9) : 1573 - 1579.
- [5] KAUSHIK S J, CRAVEDI J P, LALLES J P, et al. Partial or total replacement of fishmeal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolaemia and flesh quality in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 1995, 133 (3/4) : 257 - 274.
- [6] BARROS M M, LIM C, KLESZIUS P H. Effect of soybean meal replacement by cottonseed meal and iron supplementation on growth, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge [J]. *Aquaculture*, 2002, 207 (3/4) : 263 - 279.
- [7] WEBSTER C D, TIU L G, TIDWELL J H, et al. Growth and body composition of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing various percentages of canola meal [J]. *Aquaculture*, 1997, 150 (1/2) : 103 - 112.
- [8] SWEETMAN J. The role of yeast derived proteins in modern aqua feed formulations [J]. *International AquaFeed*, 2008, 2 (2) : 19 - 23.
- [9] LUNGER A N, CRAIG S R, MCLEAN E. Replacement of fish meal in cobia (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein [J]. *Aquaculture*, 2006, 257 (1/4) : 393 - 399.
- [10] OLIVA-TELES A, GONCALVES P. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast *Saccaromyces cerevisiae* in diets for sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles [J]. *Aquaculture*, 2001, 202 (3/4) : 269 - 278.
- [11] 崔敏, 郭冉, 夏辉. 生物饲料酵母替代鱼粉对大菱鲆的影响 [J]. *饲料研究*, 2011(5) : 65 - 68.
- [12] BURRELLS C, WILLIAMS P D, SOUTHGATE P J, et al. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout to increasing dietary concentrations of soybean proteins [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, 72 (3/4) : 277 - 288.
- [13] LIM C, BEAMES R M, EALES J G, et al. Nutritive values of low and high fibre canola meals for shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 1997, 3 (4) : 269 - 279.
- [14] SMITH P, HINEY M P, SAMUELESEN O B. Bacterial resistance to antimicrobial agent used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning [J]. *Annual review of fish diseases*, 1994, 4 : 273 - 313.
- [15] ALDEMAN D J, HASTIN T S. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 1998, 33 (2) : 139 - 155.
- [16] CABELLO F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (7) : 1137 - 1144.
- [17] SAKAI M. Current research statue of fish immunostimulant [J]. *Aquaculture*, 1999, 172 : 63 - 92.
- [18] HARIKRISHNAN R, BALASUNDARAM C, HEO M S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish [J]. *Aquaculture*, 2011, 317 (1/4) : 1 - 15.
- [19] SMITH V J, CHISHOLM J R S. Non-cellular immunity in crustaceans [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1992, 2 (1) : 1 - 31.
- [20] LIU H P, SODERHALL K, JIRAVANICHPAISAL P. Antiviral immunity in crustaceans [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27 (2) : 79 - 88.
- [21] 黄旭雄, 周洪琪, 宋理平. 急性感染对中国明对虾免疫水平的影响 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31 (3) : 325 - 331.
- [22] 黄旭雄, 周洪琪, 蔡生力. 甲壳动物的免疫系统组成及免疫机理 [J]. *上海水产大学学报*, 2005, 14 (3) : 301 - 306.
- [23] 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.
- [24] HOFFMANN J A. The immune response of *Drosophila* [J]. *Nature*, 2003, 426 (6) : 33 - 38.
- [25] IMLER J L, HOFFMANN J A. Toll receptors in innate immunity [J]. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11 (7) : 304 - 311.
- [26] YANG L S, YIN Z X, LIAO J X, et al. A Toll receptor in shrimp [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44 (8) : 1999 - 2008.
- [27] 冯伟, 李健, 李吉涛, 等. Vc 对中国对虾非特异免疫因子及 TLR/NF-B 表达量的影响 [J]. *水产学报*, 2011, 35 (2) : 200 - 208.
- [28] 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功能和溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 表达的影响 [J]. *水产学报*, 2011, 35 (7) : 1081 - 1089.
- [29] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 80 - 105.
- [30] 黄旭雄, 周洪琪. 不同规格中国明对虾的非特异性免疫水平 [J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15 (1) : 7 - 11.
- [31] 王秀霞, 丛丽娜, 王丹, 等. 海刺参 i 型溶菌酶基因的重组表达及抑菌谱分析 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25 (2) : 189 - 194.
- [32] 荣晓花, 凌沛学. 溶菌酶的研究进展 [J]. *中国生化药物杂志*, 1999, 20 (6) : 319 - 320.

- [33] LI P, GATLIN III D M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) [J]. *Aquaculture*, 2003, 219 (1/4) : 681 - 692.
- [34] HOSEINIFAR S H, MIRVAGHEFIB A, MERRIFIELD D L. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile, beluga (*Huso huso*) [J]. *Aquaculture*, 2011, 318 (1/2) : 90 - 94.
- [35] 吴建国,黄兆斌,王波. 不同蛋白源饲料对方斑东风螺生长的影响 [J]. 厦门大学学报:自然科学版,2009, 48 (4) : 600 - 605.
- [36] BURRELLS C, WILLIAM P D, FORNO P F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 1. Effects on resistance to diseases in salmonids [J]. *Aquaculture*, 2001, 199 (1/2) : 159 - 169.
- [37] SAJEEVAN T P, ROSAMMA P, SINGH I S B. Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 257: 150 - 155.
- [38] SCHULZ E, OSLAGE H J. Composition and nutritive value of single-cell protein (SCP) [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1976, 1 (1) : 9 - 24.
- [39] DE LA HUIGUERA M, SANCHEZ-MUNIZ F J, MATAIXT F J, et al. Nitrogen utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed on the yeast *Hansenula anomala* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1981, 69 (3) : 583 - 586.
- [40] TACON A G J, COOKE D J. Nutritional value of dietary nucleic acids to trout [J]. *Nutrition Reports International*, 1980, 22 (5) : 631 - 640.
- [41] DAVIES S J, WAREHAM H. A preliminary evaluation of an industrial single cell protein in practical diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) [J]. *Aquaculture*, 1988, 73 (1/4) : 189 - 199.
- [42] 许兵, 纪伟尚. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究 [J]. 海洋学报, 1993, 1 (1) : 98 - 106.
- [43] YOKOYAMA M, NAKAZOE J. Effects of dietary-protein levels on free amino-acid and glutathione contents in the tissues of rainbow-trout [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1991, 99 (1/2) : 203 - 206.
- [44] PASCUAL P, PEDRAJAS J R, TORIBIO F, et al. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*) [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2003, 145 (2) : 191 - 199.
- [45] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制 [J]. 海洋科学, 1995 (4) : 1 - 3.
- [46] FOURNIER V, HUELVAN C, DESBRUYERES E. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 236 (1/4) : 451 - 465.
- [47] 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.
- [48] YE X, GAO F Y, ZHENG Q M, et al. Cloning and characterization of the tiger shrimp lysozyme, [J]. *Molecular Biology Reports*, 2008, 35 (2) : 1239 - 1246.
- [49] 郑清梅, 叶星, 白俊杰, 等. 短沟对虾和凡纳对虾溶菌酶 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12 (4) : 482 - 483.
- [50] 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.
- [51] 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 (1) : 51 - 58.
- [52] 钟国防, 钱曦, 华雪铭, 等. 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 [J]. 水产学报, 2010, 34 (7) : 1121 - 1128.
- [53] NUSSLEIN-VOLHARD C, LOHS-SCHARDIN M, SANDER K, et al. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 283: 474 - 476.
- [54] HASHIMOTO C, HUDSON K L, ANDERSON K V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein [J]. *Cell*, 1988, 52 (2) : 269 - 279.
- [55] WANG H C, TSENG C W, LIN H Y, et al. RNAi knockdown of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (*LvToll*) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harvey* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34 (1) : 49 - 58.

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*

WANG Wu-gang, LUO Ci-xing, HUANG Xu-xiong, GUO Teng-fei, FENG Long-feng
(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The basal diet (A) contains 25% fish meal as control, and four isonitrogenous isoenergetic yeast extract experiment diets, which substituted 15% (B), 30% (C), 45% (D) and 60% (E) fish meal in basal diet, were fed to the *Litopenaeus vannamei* (7.50 ± 0.13) g respectively for 42 d, then superoxide dismutase (SOD) activity and lysozyme (LSZ) activity in haemolymph and the expressions of lysozyme mRNA and Toll receptor mRNA in gill were detected. The shrimp were also challenged with *Vibrio alginolyticus*. The results showed that: LSZ activity in haemolymph in 15% group was significantly higher than that of control ($P < 0.05$). There was no significant difference of SOD activity in haemolymph, the expressions of lysozyme mRNA and Toll Receptor mRNA in gill between alternative groups and control group ($P > 0.05$). The cumulative mortality of 60% group at 24 h and 48 h was significant higher than that of control ($P < 0.05$), and there was no significant difference of cumulative mortality between alternative groups and control group at 72 h and 96 h ($P > 0.05$). It is therefore suggested that yeast extract can replace 45% fish meal of the diets without affecting immunity and vibrio-resistant ability of the shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; yeast extract; lysozyme; SOD; lysozyme mRNA; Toll receptor mRNA