

文章编号: 1674 - 5566(2014)06 - 0842 - 06

凡纳滨对虾在微囊藻毒素 (MC-LR) 诱导下 3 种抗菌肽基因的表达量分析

李 智¹, 傅一鸣¹, 李 响², 柳峰松², 刘利平¹

(1. 上海海洋大学 农业部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘 要: 蓝藻水华可产生大量藻毒素, 其中以微囊藻毒素危害最大。研究表明微囊藻毒素可影响包括虾类在内的多种水生生物的生长和繁殖, 亦可导致虾类免疫系统受损。本研究通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测了在微囊藻毒素 MC-LR 作用下, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 体液免疫中 3 种主要的抗菌肽基因 (*Penaeidin 3*、*Crustin* 和 *ALF*) 的表达量变化情况, 发现 *Penaeidin 3* 和 *ALF* 受到 MC-LR 影响较大, *Crustin* 基因表达量虽有所上调, 但变化不大。同时, 通过再次注射鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 对 3 种抗菌肽在 MC-LR 影响下抗菌能力的检测, 发现 3 种抗菌肽表现出相对一致的变化, 即表达量均在前期下调, 4 h 后逐渐上调, 在 MC-LR 处理组中的表达量低于对照组的趋势。结果表明 MC-LR 可能通过直接或间接的方式影响对虾 3 种抗菌肽基因的表达, 对免疫系统造成损伤, 致使对虾抗病能力减弱; 这一结果表明, 长期发生铜绿微囊藻水华的虾池对虾存活率下降, 可能与微囊藻毒素影响对虾抗菌肽基因的表达有关。

研究亮点: 本研究表明 MC-LR 可使凡纳滨对虾体内 3 种抗菌肽基因的表达发生改变, 抗菌性下降, 为进一步了解 MC-LR 对虾类免疫系统的致毒机理提供了新的研究途径。

关键词: 凡纳滨对虾; 微囊藻毒素; 体液免疫; 抗菌肽

中图分类号: Q 175
文献标志码: A

伴随人类工业化生产的发展, 水环境污染日益加重, 水体富营养化导致蓝藻水华在我国淡水湖泊和河流时常爆发。蓝藻水华爆发可产生大量的蓝藻毒素, 并通过食物链传递在各营养级中实现生物累积^[1-2], 严重威胁水产养殖行业的发展^[3]。在这些毒素中影响最大, 分布最广的便是微囊藻毒素。微囊藻毒素 (Microcystin, MC) 可由微囊藻属 (*Microcystis*)、鱼腥藻 (*Anabaena*)、颤藻 (*Oscillatoria*) 和念珠藻 (*Nostoc*) 等多种藻类产生^[4], 是一类具有生物活性的单环七肽肝毒素, 自然条件下存在多种异构体^[5-6]。本研究选取的 MC-LR 是众多异构体中毒性较强, 研究较广的一种。

虾类作为重要的水产经济动物, 在养殖过程中常常面临着微囊藻毒素的威胁^[7]。

GALANTI^[8] 研究发现 MC-LR 和 NOD 等蓝藻毒素可在淡水青虾 (*Palaemonetes argentinus*) 体内累积并自然消除, 期间谷胱甘肽还原酶 (GR)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 和过氧化氢酶 (CAT) 等多种酶的活性均发生改变。乐亚玲等对克氏原螯虾的研究中发现了类似的现象, 并且发现其细胞吞噬能力受到了明显的抑制^[9-10]。GONÇALVES-SOARES 等^[11] 在对凡纳滨对虾注射微囊藻毒素提取物后发现, 其体内 GST 和 CAT 的基因表达量均出现了上调的趋势, 用于抵御 MCs 造成的氧化应激效应。

抗菌肽是甲壳动物体液免疫中的重要组分, 自首次由 DESTOUMIEUX 等^[12] 发现并报道后就得到了广泛关注。目前可大致将对虾抗菌肽分为 3 类: Penaeidins、Crustins 和 Antilipopolysaccharide

收稿日期: 2014-05-22 修回日期: 2014-07-16

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (31101914); 美国国际发展署 (AquaFish CRSP) 项目 (3001325371)

作者简介: 李 智 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生动物毒理学。E-mail: lizhi_shou@163.com

通信作者: 刘利平, E-mail: lp-liu@shou.edu.cn

factors (ALFs)。它们的表达能够应答于不同病原体的入侵,并迅速合成抗菌肽杀死病原微生物^[13-15]。抗菌肽作为对虾体液免疫中重要的一环,在对虾受到 MCs 毒性影响时,其表达量会出现何种变化,是否会导致对虾的抗菌能力下降,进而导致对虾的免疫系统受到影响,目前尚未有研究报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用凡纳滨对虾购于上海市芦潮港镇对虾养殖场。随机挑选体重 10~15 g 的成虾,暂养于 50 L 的玻璃缸水循环系统中,水温控制在 18~25 °C,光照条件与自然条件相同。实验前 12 h 停止喂食,及时清理粪便和死虾。

微囊藻毒素(MC-LR)标准品购自瑞士 Alexis Biochemicals 公司,标准品型号为 ALX-350-012-C100。实验前将 MC-LR 粉末充分溶解于 PBS 缓冲液中。

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)菌种由上海海洋大学国家水生动物病原库提供,使用营养琼脂在恒温培养箱中进行扩培。

1.2 实验方法

1.2.1 注射剂量及方法

MC-LR 注射剂量参考 GONÇALVES-SOARES 等^[11]的实验,通过预实验测定半致死剂量 LD₅₀。根据实验结果将 MC-LR 注射剂量最终定为每千克虾重 100 µg;对照组注射等体积的 PBS 溶液。

鳃弧菌注射剂量参考 WANG 等^[16]的实验,通过预实验计算出半致死剂量 LD₅₀。根据实验结果,将鳃弧菌注射剂量最终定为 1.0 × 10⁵ cell/mL,每尾虾注射 20 µL PBS 菌悬液。

注射前向溶液中添加 0.025% 的酚红,作为颜色指示剂。由对虾腹部第二对游泳足中央的血窦处进行注射。

1.2.2 分组情况

MC-LR 注射实验中,随机挑选健康成虾分为 MC-LR 注射组(M 组)与对照组(C 组),每组各 50 尾虾;抗菌性检验实验中,随机挑选健康成虾各 50 尾,分别注射等量 MC-LR 与 PBS 溶液,注射

8 h 后对 2 组虾注射等量的鳃弧菌和 PBS 溶液,2 组分别命名为 MV 组和 CV 组。

1.2.3 样品采集

在 MC-LR 注射实验中,注射前随机挑选 4 尾虾,分别取 3 g 肝胰腺样品放入 1.5 mL 离心管中,置于液氮中保存备用。注射后 1、2、4、6、8、12、24、48、72 h 分别从各组中随机挑选 4 尾虾进行肝胰腺样品采集。

在抗菌性检验实验中,在注射鳃弧菌后 1、2、4、6、12、24 h 分别从各组中随机挑选 4 尾虾进行肝胰腺样品的采集。

1.2.4 总 RNA 抽提及反转录

利用 RNAiso Plus (TaKaRa)进行总 RNA 抽提,操作过程遵照产品说明进行。抽提得到的总 RNA 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行质量检验。使用 K5600 超微量分光光度计(北京凯奥)进行 RNA 浓度测定。每个样品取 500 ng RNA 作为模板,利用 EasyScript Reverse Transcriptase (TRANSGEN)试剂盒进行反转录,合成 cDNA 模板。

1.2.5 引物设计及 qRT-PCR

实验所选 3 种对虾抗菌肽基因的 GenBank 编号分别为 *Penaeidin 3* (DQ206403.1)、*Crustin* (AY486426.1)和 *ALF* (GQ227486.1),内参基因参考 GONÇALVES-SOARES 等^[11]的实验,选用 *ATP synthase* (EU194608.1)。引物设计使用软件 Primer Premier 5.0 完成,引物由生工生物工程(上海)合成,引物序列见表 1。

qRT-PCR 所用试剂盒为 TransStart Green qPCR SuperMix (TRANSGEN),所用荧光定量 PCR 仪为 C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad)。反应体系设为 10 µL, cDNA 模板:SYBR Green:引物 F:引物 R = 8:10:1:1。反应程序为 95 °C 1 min;95 °C 20 s,65 °C 30 s,40 个循环;65~95 °C 区间以 0.5 °C 为梯度绘制熔解曲线。

使用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 *t* 检验,分析所得数据 $P < 0.05$ 为差异显著。使用 GraphPad Prism 5 进行图表绘制。

表 1 实验所用引物序列及退火温度

Tab. 1 Primer sequences and their annealing temperature

基因名称	引物序列(5' - 3')	退火温度/℃
<i>Penaeidin 3</i>	F; GTTGACGGAGAACACCGATGAA	61.09
	R; CATTCCACAAGCCAGACTAAGA	59.38
<i>Crustin</i>	F; AGTAGGTGTTGGTGGTGGTTTC	60.19
	R; CAGTCGCTTGTGCCAGTTC	60.61
<i>ALF</i>	F; CACCGTCAAACCTTACATCAAG	59.53
	R; GTTAGTTCAGCCACCGCTTAG	59.05
ATP synthase	F; TCCCTGAAGCAGCAACTC	53.50
	R; TGGCAATAAATGGCTAAAC	51.50

2 结果

2.1 MC-LR 注射后抗菌肽基因表达变化

图 1 所示为 MC-LR 注射后不同时间段内凡纳滨对虾体内 3 种抗菌肽 (*Penaeidin 3*、*Crustin* 和 *ALF*) 基因表达量的变化情况。

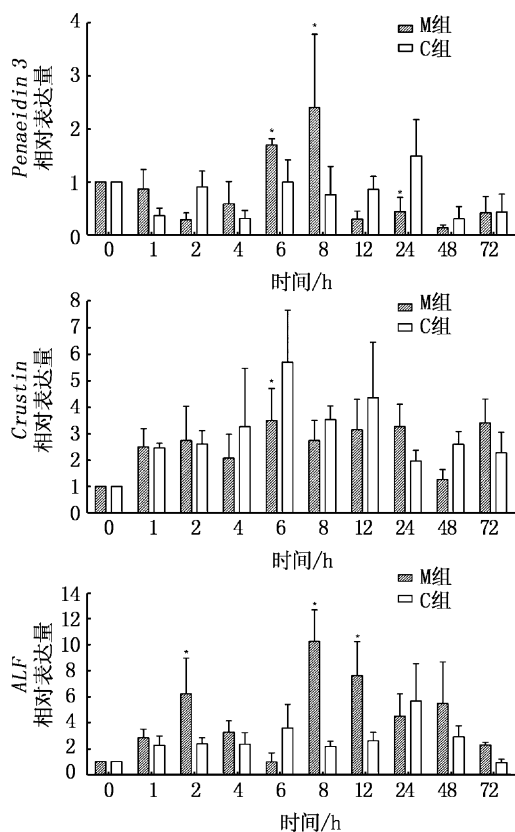


图 1 MC-LR 注射后不同时间段 *Penaeidin 3*、*Crustin* 和 *ALF* 基因的相对表达量

Fig. 1 Expression profiles of *Penaeidin 3*, *Crustin* and *ALF* after being injected with MC-LR

M 组代表 MC-LR 注射组; C 组代表 PBS 注射组; “*”号代表 M 组与 C 组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

MC-LR 注射后, *Penaeidin 3* 基因在 6 h 和 8 h 时表达量显著高于对照组, 而在注射后的 24 h 显著低于对照组。在分别注射 MC-LR 和 PBS 后, *Crustin* 基因在 M、C 两组均明显上调, 然而两组间的表达量缺乏明显差异性, 仅在 6 h 时 M 组中的 *Crustin* 基因表达量显著低于 C 组。

ALF 基因在 2, 8, 12 h 的表达水平比对照组高, 两组间存在明显的表达差异性 ($P < 0.05$)。在 8 ~ 12 h 时间段内, MC-LR 注射组中 *ALF* 的表达量显著高于对照组, 在 8 h 时达到最大值; 在随后的 24 ~ 72 h 时间段内, 两组中的表达量趋于相似, 无显著差异。

2.2 免疫应答实验

图 2 所示为鳃弧菌注射后不同时间段内凡纳滨对虾体内 3 种抗菌肽 (*Penaeidin 3*、*Crustin* 和 *ALF*) 基因表达量的变化情况。

在鳃弧菌注射后, *Penaeidin 3* 基因在 MV 组和 CV 组中的表达量变化并不明显, 两组间的表达量差异不大, 仅在鳃弧菌注射后 2 h 时 (即 MC-LR 注射后 10 h 时) 显著下调, 与 CV 组存在显著性差异。 *Crustin* 基因在注射鳃弧菌之后表达量变化不明显, 不存在显著性差异。 *ALF* 基因仅在鳃弧菌注射后 4 h 时 (即 MC-LR 注射后 12 h 时) MV 组与 CV 组的表达量存在显著差异, 其余时间段两组间差异不显著。此外, 从表达量进行分析, 可得出 MV 处理组中低于对照组的趋势。

3 讨论

研究表明, MCs 可严重影响虾类等水生生物的生存^[7], 制约了养殖生产行业的发展。MCs 可以导致虾类血细胞数量减少, 细胞吞噬能力减弱, POD、SOD 等抗氧化酶类被抑制^[9-10]。MCs 可通过抑制 GST 和 CAT 的基因表达量来实现对

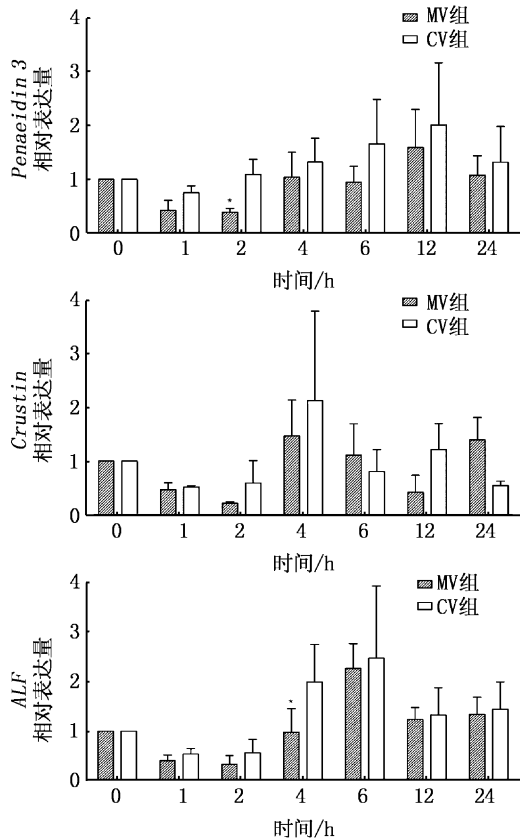


图2 鳎弧菌注射后不同时间 *Penaeidin 3*、*Crustin* 和 *ALF* 基因的相对表达量

Fig. 2 Expression profiles of *Penaeidin 3*, *Crustin* and *ALF* after being injected with *V. anguillarum*

MV 组代表鳎弧菌注射前注射 MC-LR 组; CV 组代表鳎弧菌注射前注射 PBS 组; “*” 号代表 MV 组与 CV 组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

虾类体液免疫系统的削弱,导致虾类死亡^[11]。而抗菌肽作为虾类体液免疫系统中重要的一环,MCs 是否会对其造成损伤,目前国内外无明确的证据。从以往的研究成果来看,3 种抗菌肽在应对不同病原时的表达量变化趋势各不相同。当注射不同剂量的 LPS 时,凡纳滨对虾体内 *Pen 2*、*Pen 3*、*Pen 4* 和 *Crustin* 基因均发生下调,且具有剂量依赖性^[17]。当被 WSSV 感染时,凡纳滨对虾体内 *Pen 3* 和 *Crustin* 基因表达量均上调^[18]; ANTONY 等^[19] 则发现斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 体内 *ALF* 基因表达量持续上调,而 *Pen 3* 和 *Pen 5* 基因仅在前期上调,*Crustin* 基因仅在后期上调。当使用哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 作为刺激物时,凡纳滨对虾体内 *ALF* 先上调,略微下调后持续上调;*Crustin* 持续上调;*Pen 2* 先上调,后显著下调,18 h 后上调;*Pen 3* 在 6 ~ 18 h 时上

调;*Pen 4* 在 18 h 后显著上调^[20]。WANG 等^[16] 分别使用革兰氏阳性菌(微球菌, *Micrococcus lysodeikticus*) 和革兰氏阴性菌(鳎弧菌)对中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 进行注射,结果发现 *Pen 3* 在注射微球菌后 1 h 上调,但在注射弧菌 1 h 后却明显下调。而 *Pen 5*、*Crustin* 和 *ALF* 在注射弧菌 1 h 后呈现上调的趋势;当注射物换为微球菌后,*Pen 5* 和 *Crustin* 的转录水平有所下调,*ALF* 则没有明显变化。在注射微球菌或弧菌 12 h 和 24 h 后,*Crustin* 和 *ALF* 明显上调以应对感染,*Pen 3* 和 *Pen 5* 则呈现下调的趋势。

在本次研究中,我们通过 qRT-PCR 技术对 MC-LR 作用下凡纳滨对虾 3 种抗菌肽 (*Penaeidin 3*、*Crustin* 和 *ALF*) 基因表达量的变化情况进行了调查,发现 MC-LR 注射后 3 种抗菌肽的表达量变化趋势并不一致。其中 *Penaeidin 3* 与 *ALF* 基因的表达量受到 MC-LR 注射的影响较大,*Crustin* 基因的表达则未出现显著变化。在 MC-LR 注射后,*Penaeidin 3* 的相对表达量在前期出现下调,可能原因是 MC-LR 导致凡纳滨对虾体内的 ROS 迅速升高,造成了细胞内 DNA 的损伤,*Penaeidin 3* 表达受阻^[21]。MC-LR 在动物体内可经代谢清除出体外^[22],因此在注射后 6 ~ 8 h 时对虾体内 MC-LR 浓度下降,对细胞造成的影响减弱,*Penaeidin 3* 表达量再次上升。最终由于 MC-LR 被彻底清除,*Penaeidin 3* 表达量趋于平缓,但由于细胞损伤其表达量仍低于对照组。而 *Crustin* 在 M 组和 C 组中均一直保持较高的表达量。与对照相比,MC-LR 对 *Crustin* 的表达量影响并不显著,但是值得注意的是实验组中 *Crustin* 的表达量在整个实验过程的大部分时间仍是低于对照组,可能是由于 MC-LR 引起的细胞损伤,间接造成了其表达量的微小变化。*ALF* 作为一种作用范围较广的抗菌肽,可以对细菌、真菌、病毒等多种外源因子产生反应^[23]。在注射后 2 h 内,其表达量立刻上调,相比初始值和对照组的表达量均有显著变化。随后由于 MC-LR 造成的 ROS 上升,其表达量明显下调。在 8 ~ 12 h 时由于机体清除了部分 MC-LR,*ALF* 的表达量再次显著上调,这点与 *Penaeidin 3* 的变化趋势相似。

MC-LR 对 3 种抗菌肽的影响虽然并不一致,但是在抗菌性检验实验中却表现出一定的一致性。本研究发现,当再次向凡纳滨对虾注射鳎弧

菌后,3种抗菌肽基因均呈现前2h下调,4~6h后再上调的变化趋势。OKUMURA^[17]研究发现,弧菌可造成细胞内RNA降解,导致*Crustin*等抗菌肽基因的表达量下降,与本次实验观察到的现象一致。同时,3种抗菌肽在注射鳗弧菌后,MV组和CV组之间存在表达量显著性差异的情况并不多。*Penaeidin 3*在鳗弧菌注射后2h表现出明显的下调趋势,恰好为MC-LR注射后10h,此时*Penaeidin 3*的表达量正好从8h的峰值开始下降。ALF基因在鳗弧菌注射后4h时较对照组显著下调,而在MC-LR注射实验中MC-LR注射12h时ALF表现为显著上调,两组实验中表达量的差异可能是由于鳗弧菌注射前,MC-LR使凡纳滨对虾体内ROS升高,导致细胞内DNA损伤^[21, 24],影响了抗菌肽基因的表达,使得MV组中表达量有所降低。

Toll信号通路和IMD信号通路是对虾体内已知的关键性信号转导通路,能够识别外来病原并调控抗菌肽的表达。WANG等^[20]的研究表明,当*LvToll*基因敲除后,凡纳滨对虾体内抗菌肽表达量降低,抗菌活性下降,体内细菌数量增加,死亡率明显提高;在WANG等^[16]的研究中,当使用RNA干扰技术对IMD通路上的*Relish*基因的表达进行抑制后,中国对虾体内ALF、*Crustin*、*Pen 3*和*Pen 5*等多种抗菌肽基因的表达量受到了影响,抗菌活性下降。在本研究中,*Crustin*和*Penaeidin 3*的表达量变化并未表现出和MC-LR注射存在明显的直接免疫应答关系。是否可能是MC-LR通过改变了Toll通路或IMD通路上相关蛋白的基因表达,进而影响了抗菌肽基因的表达,这点有待后续进一步研究。

参考文献:

- [1] ZHANG D, XIE P, CHEN J, et al. Determination of microcystin-LR and its metabolites in snail (*Bellamya aeruginosa*), shrimp (*Macrobrachium nipponensis*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from Lake Taihu, China[J]. *Chemosphere*, 2009, 76(7): 974-981.
- [2] CHEN J, ZHANG D, XIE P, et al. Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(10): 3317-3322.
- [3] CHEN J, XIE P, LI L, et al. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage[J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 108(1): 81-89.
- [4] CODD G A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control[J]. *Ecological Engineering*, 2000, 16(1): 51-60.
- [5] DAWSON R. The toxicology of microcystins[J]. *Toxicon*, 1998, 36(7): 953-962.
- [6] DIETRICH D, HOEGER S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 203(3): 273-289.
- [7] 查广才, 周昌清, 牛晓光. 铜绿微囊藻对凡纳滨对虾低盐度养殖的危害研究[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2007, 46(2): 64-67.
- [8] GALANTI L N, AMÉ M V, WUNDERLIN D A. Accumulation and detoxification dynamic of cyanotoxins in the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus* [J]. *Harmful Algae*, 2013, 27: 88-97.
- [9] 乐亚玲, 刘利平, 李慷, 等. 铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼虾存活及成虾几种酶类的影响[J]. *水产学报*, 2011, 35(8): 1158-1165.
- [10] 苏晓明, 乐亚玲, 刘利平. 微囊藻毒素对克氏原螯虾血细胞吞噬能力的影响[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(11): 115-118.
- [11] GONÇALVES-SOARES D, ZANETTE J, YUNES J S, et al. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain [J]. *Marine Environmental Research*, 2012, 75: 54-61.
- [12] DESTOUMIEUX D, BULET P, LOEW D, et al. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(45): 28398-28406.
- [13] LI L, WANG J X, ZHAO X F, et al. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 39(2): 144-151.
- [14] ZHANG J, LI F, WANG Z, et al. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127(4): 605-614.
- [15] LIU F, LIU Y, LI F, et al. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(6): 600-608.
- [16] WANG D, LI F, LI S, et al. Expression profiles of antimicrobial peptides (AMPs) and their regulation by Relish [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2012, 30(4): 611-619.

- [17] OKUMURA T. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(1): 68–76.
- [18] GARCÍA J C, REYES A, SALAZAR M, et al. Differential gene expression in White Spot Syndrome Virus (WSSV)-infected naïve and previously challenged Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus vannamei)* [J]. Aquaculture, 2009, 289(3): 253–258.
- [19] ANTONY S P, PHILIP R, JOSEPH V, et al. Anti-lipopolysaccharide factor and crustin-III, the anti-white spot virus peptides in *Penaeus monodon*: Control of viral infection by up-regulation [J]. Aquaculture, 2011, 319(1): 11–17.
- [20] 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.
- [21] ŽEGURA B, GAJSKI G, ŠTRASER A, et al. Microcystin-LR induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2011, 726(2): 116–122.
- [22] 苏晓明, 刘利平, 陈桃英, 等. 铜绿微囊藻对大型溞的毒性及毒素在其体内累积和清除的研究 [C]. 中国水产学会学术年会论文摘要集, 2012.
- [23] DE LA VEGA E, O'LEARY N A, SHOCKEY J E, et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection [J]. Molecular Immunology, 2008, 45(7): 1916–1925.
- [24] GAUDIN J, HUET S, JARRY G, et al. *In vivo* DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: Comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2008, 652(1): 65–71.

Expression profiles of three antimicrobial peptide genes in *Litopenaeus vannamei* induced by microcystin (MC-LR)

LI Zhi¹, FU Yi-ming¹, LI Xiang², LIU Feng-song², LIU Li-ping¹

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 2. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China)

Abstract: Microcystins (MCs) are a kind of cyanobacterial toxins produced by cyanobacterial bloom. They can affect the growth and reproduction of a variety of aquatic organisms, such as shrimp. In this study, the expression profiles of three antimicrobial peptide genes (*Penaeidin 3*, *Crustin* and *ALF*) in *Litopenaeus vannamei* were detected via real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) method post MC-LR injection. The results show that MCs can significantly affect the expression of *Penaeidin 3* and *ALF* but cannot affect that of *Crustin*. In order to understand the impact of MC-LR on the response of the three peptides to bacteria, *Vibrio anguillarum* was injected into the shrimps after MC-LR injection. The relative expressions of three antimicrobial peptide genes were all down-regulated in the early stage and up-regulated after 4 h post *Vibrio anguillarum* challenge. Expressions of three genes in MC-LR injected group were all down-regulated compared with the control group. The results suggest that MC-LR could affect the expressions of antimicrobial peptide genes in unknown ways and impact the shrimp immune system.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; microcystins; humoral immunity; antimicrobial peptides