

读书报告

Reading Report

汇报人：朱振祥

时间：2018年4月14日

题目



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi



Full length article

Effect of dietary *Clostridium butyricum* on growth, intestine health status and resistance to ammonia stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*

Yafei Duan, Yue Zhang, Hongbiao Dong, Yun Wang, Xiaoting Zheng, Jiasong Zhang*

Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, PR China



Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, PR China

Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute,

Yafei Duan, Yue Zhang, Hongbiao Dong, Yun Wang, Xiaoting Zheng, Jiasong Zhang

目录CONTENT

- 1 研究背景
- 2 材料方法
- 3 实验结果
- 4 讨论分析



01

研究背景

“南朝四百八十寺，多少楼台烟雨中”

——《江南春》

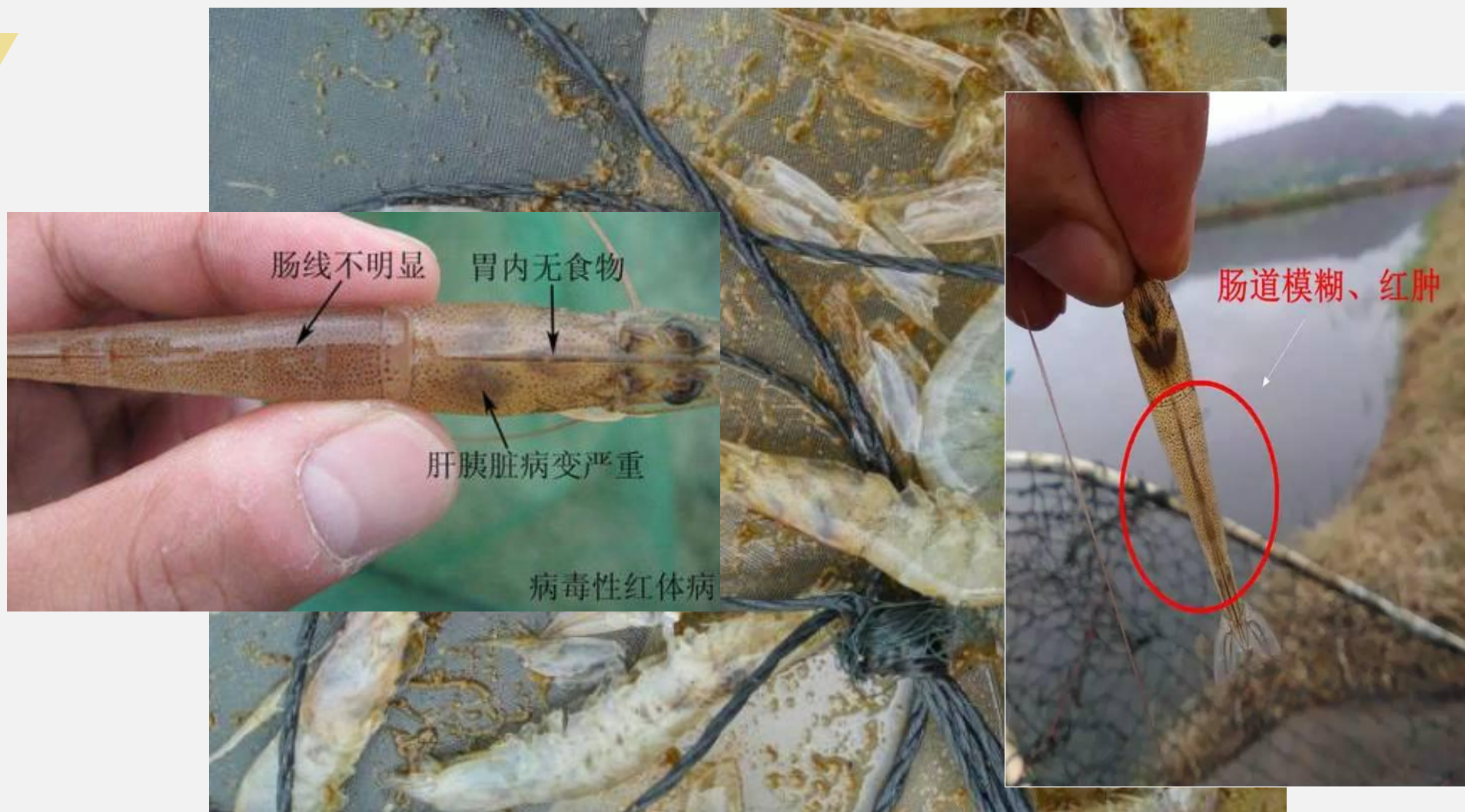
研究背景



南美白对虾：学名凡纳滨对虾，属节肢动物门、甲壳纲、十足目、游泳亚目、对虾科、对虾属，是广温广盐性热带虾类。

成体最长可达24cm，甲壳较薄，正常体色为浅青灰色，全身不具斑纹。肉质鲜美，具有很高的**经济价值**。

研究背景



肠道被视为消化和吸收中心，**消化酶**在消化中起着非常重要的作用。

另外肠道不断暴露于食物中可能存在的病原体以及外来的寄生虫中。且虾依赖于非特异性免疫，所以**肠道结构的完整性**在维持南美白对虾肠道的健康方面起着举足轻重的作用。



Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

Liang Z¹, Liu R¹, Zhao D², Wang L³, Sun M¹, Wang M¹, Song L⁴.

Author information

Abstract

Ammonia is one of major environmental pollutants. In the present study, the mRNA expression levels of antioxidant genes, as well as the changes in the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) concentration, and binding protein (Bip) gene expression in the hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* after ammonia exposure. X-box binding protein 1 (XBP1) in the hepatopancreas of *L. vannamei* after ammonia exposure. Apoptosis was observed in the hepatopancreas of *L. vannamei* after ammonia exposure. The results indicated that ammonia exposure could induce oxidative stress, which further caused ER stress and apoptosis in hepatopancreas of *L. vannamei*.

凡纳滨对虾氨氮急性胁迫应激敏感群体和耐受群体对WSSV敏感性的差异分析

卢霞 栾生 曹宝祥 郝登春 孟宪红 曹家旺 代平 罗坤 孔杰

农业部海洋渔业可持续发展重点实验室中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 上海海洋大学水产与生命学院

导出/参考文献 + 关注 < 分享 ★ 收藏 打印 印刷版 ▼

氨是世界上水生系统的污染物之一，主要产生于未消耗的饲料和粪便等有机废弃物蛋白质的分解代谢过程，研究表明（卢霞等，2018）：**氨氮胁迫会通过增加生物体中活性氧的浓度而引起氧化应激来增加对虾对病原的敏感性**，对氨氮急性胁迫应激耐受力高的群体对病毒的抵抗力也高。

研究背景



丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)属于芽孢杆菌科,梭菌属,革兰氏阳性菌。丁酸梭菌在其代谢过程中能产生丁酸等SCFAs为肠道细胞基础代谢提供能量来源。

丁酸梭菌对肉鸡血清生化指标的影响

	对照组	丁酸梭菌 (mg/kg)			
		125	250	500	1000
Ca, mmol/L	13.27	13.01	13.18	12.84	12.57
P, mmol/L	3.50 ^b	3.69 ^b	4.33 ^a	4.29 ^a	4.44 ^a
AKP, U/L	393.17	532.92	642.15	277.51	223.65

丁酸梭菌对断奶仔猪盲肠菌群的影响

	对照组	丁酸梭菌添加量 (mg/kg)			
		250	500	1000	2000
大肠杆菌, logCFU/g	6.68 ^a	5.74 ^b	5.35 ^c	5.39 ^b	5.43 ^{bc}
沙门氏菌, logCFU/g	6.28 ^a	5.35 ^b	5.15 ^c	5.39 ^b	5.24 ^c
乳酸杆菌, logCFU/g	8.51	8.54	8.55	8.58	8.56
双歧杆菌, logCFU/g	8.62	8.64	8.69	8.72	8.73

02

材料与amp;方法

“学而不思则罔，思而不学则殆”

——《论语》

1. 养殖实验：

实验动物：南美白对虾（ $2.36 \pm 0.12\text{g}$ ）

实验安排：在过滤充气海水中暂养1周，随机分为四组，每组三个重复，每个重复30尾虾。每天投喂三次，**投饲率5%**。每天光照14h，换水一次。**养殖56天后**取肠道粪便保存备用。

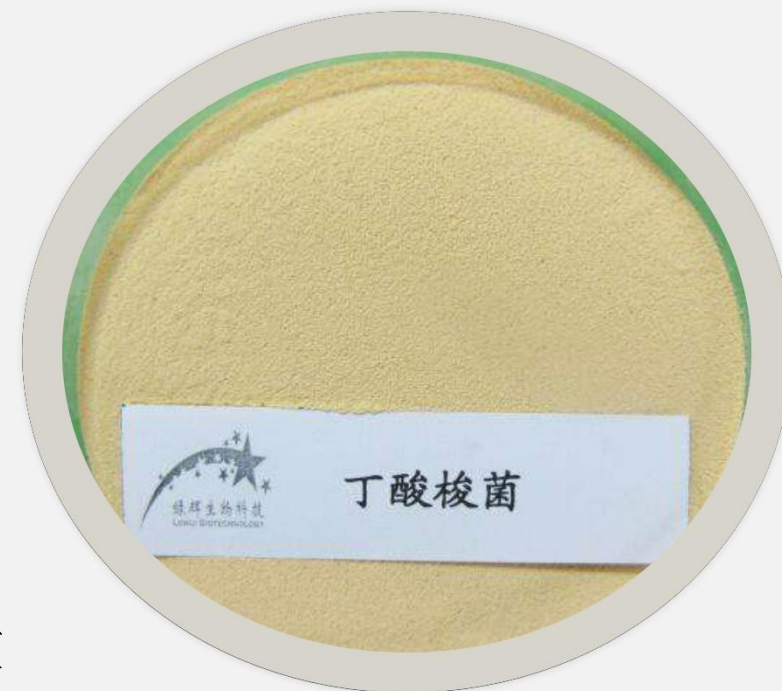


2. 饲料制作:

材料: 丁酸梭菌 (10^9 cfu/g, 购于中科生物有限公司)

组别: 对照组; 0.25%添加量组 (CB1); 0.5%添加量组 (CB2); 1.0%添加量组 (CB3)。

每天进行检查MRS平板计数法来验证益生菌的浓度, 并检查可能的污染。丁酸梭菌溶于无菌净化水中, 均匀喷撒在饲料表面, 室温下风干, 并在一天内用完。



3.氨胁迫测试:

养殖实验结束后取每组60尾虾从正常海水（盐度30‰，pH8.2，温度 $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，氨0mg/L）转移至120L含氨的海水（35毫克/升）中进行72小时的氨胁迫测试（加入10g/L 氯化铵）。并每4 h使用次溴酸盐氧化测定法进行测定以保证氨浓度的稳定。试验期间**禁食**并保持氧气充足，在**24h，48h和72h**时取样，进行免疫基因表达分析。

4.生长性能:

$$\text{Weight gain (WG, \%)} = (W_t - W_i) / W_i \times 100$$

$$\text{Specific growth rate (\%day}^{-1}\text{)} = 100 \times [\ln W_t - \ln W_i] / t$$

$$\text{Feed conversion ratio (FCR)} = W_f / (W_t - W_i)$$

$$\text{Survival (\%)} = \text{final number of shrimp} / \text{initial number of shrimp} \times 100$$

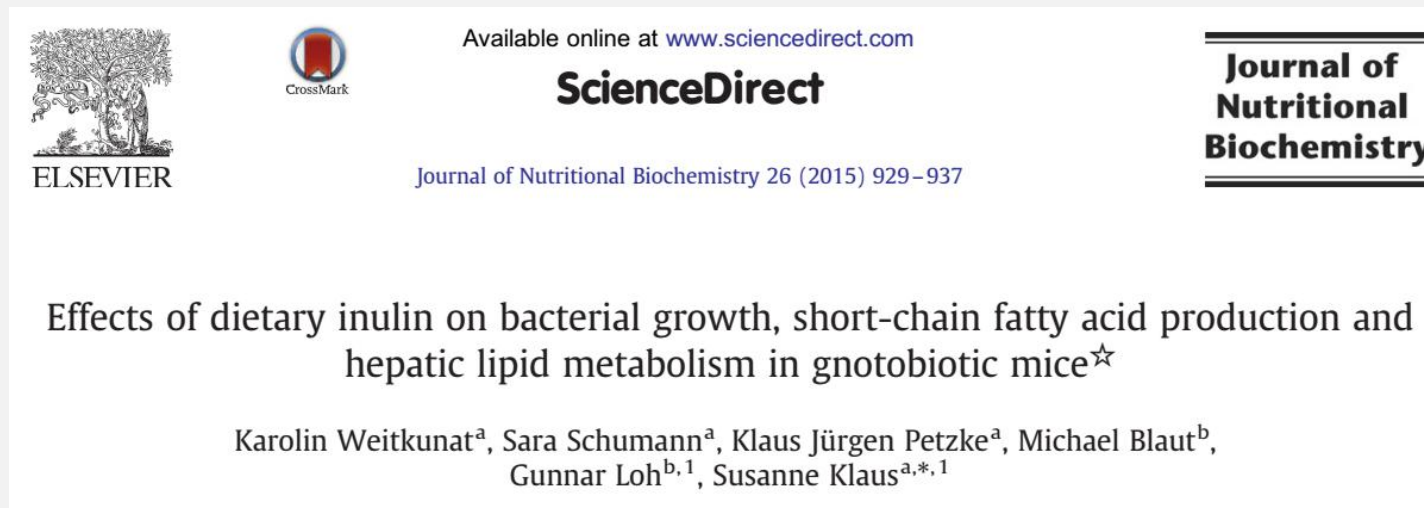
5.肠道生化分析:

使用0.9%的生理盐水将肠道匀浆为10%的匀浆液，3500r，4°C离心10min，取上清进行**蛋白酶**，**淀粉酶**，**脂肪酶**，溶菌酶，诱导性一氧化氮合酶，总抗氧化酶以及一氧化氮的测定。



6.短链脂肪酸测定和品质分析:

短链脂肪酸通过气相色谱分析测定。品质分析则测定粗蛋白，粗灰分等。



膳食中菊粉对细菌生长，短链脂肪酸生成和肝脏脂质代谢的影响

7. 免疫基因分析:

Table 1

Primer sequence used in this study.

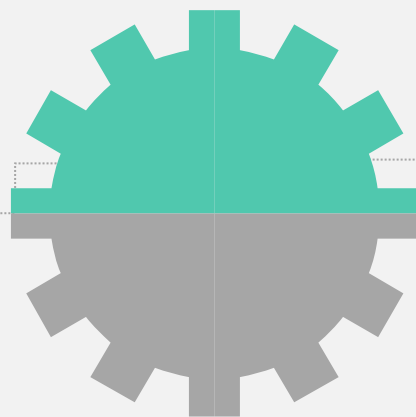
Primer name	Sequence (5'-3')	GenBank accession number
HSP70-F	AGGAGACCGCTGAGGCTTAC	AY645906
HSP70-R	AGCACATTCAGACCCGAGAT	
Toll-F	CCAGCTTAGAAGACCGGCAA	DQ923424
Toll-R	GTTGTCCGAGCAGAAGTCCA	
Imd-F	TGGGTCCGTGTCCAGTGATT	FJ592176
Imd-R	AGAGCCGCCGGTTATGTTGT	
β -actin-F	GCCCTGTTCCAGCCCTCATT	AF300705
β -actin-R	ACGGATGTCCACGTCGCACT	

材料和方法

HE染色



4%多聚甲醛固定2h，
流水冲洗8h，酒精梯
度脱水，切片4mm。



数据分析

利用SPSS进行单因
素方差分析。

03

实验结果

“耳闻之不如目见之，目见只不如足见之”

——刘向

1. 生长性能和饲料利用率

Table 2

Growth performance of *L. vannamei* fed the control diet and three *C. butyricum*-containing diets for 56 d.

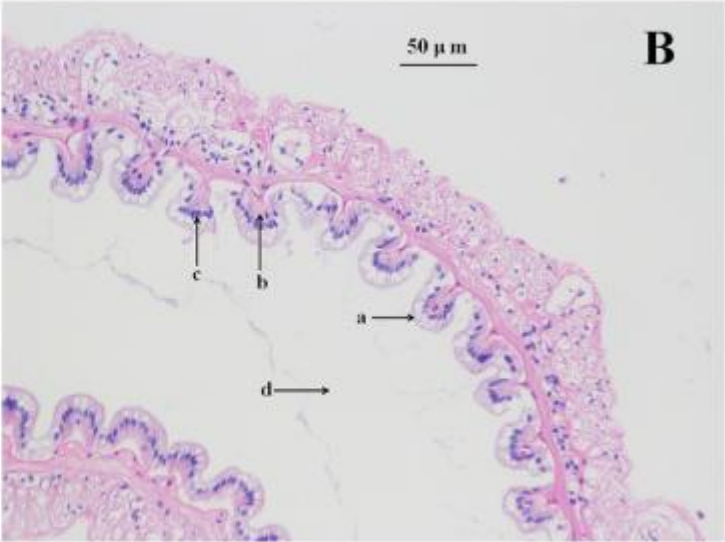
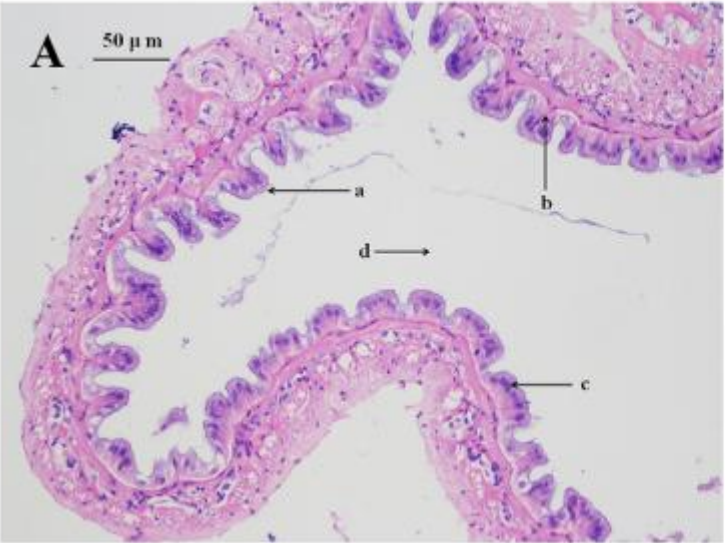
Parameters	Control	CB1	CB2	CB3
Initial weight (g)	2.90 ± 0.03 ^a	2.89 ± 0.02 ^a	2.92 ± 0.05 ^a	2.85 ± 0.03 ^a
Final weight (g)	16.60 ± 1.36 ^a	19.22 ± 1.53 ^b	20.10 ± 1.62 ^b	20.54 ± 1.89 ^b
Weight gain (%)	472.12 ± 8.56 ^a	565.36 ± 10.19 ^b	588.57 ± 12.35 ^b	621.24 ± 13.93 ^b
Specific growth rate (%day ⁻¹)	3.12 ± 0.12 ^a	3.38 ± 0.10 ^b	3.45 ± 0.07 ^b	3.53 ± 0.12 ^b
Feed conversion rate (FCR)	1.65 ± 0.06 ^a	1.53 ± 0.05 ^b	1.45 ± 0.08 ^b	1.41 ± 0.04 ^b
Survival (%)	93.33 ± 2.46 ^a	95.55 ± 2.13 ^a	96.67 ± 1.78 ^a	94.44 ± 1.86 ^a

Vertical bars represented the mean ± SE (N = 3). Data indicated with different letters were significantly different (P < 0.05) among treatments.

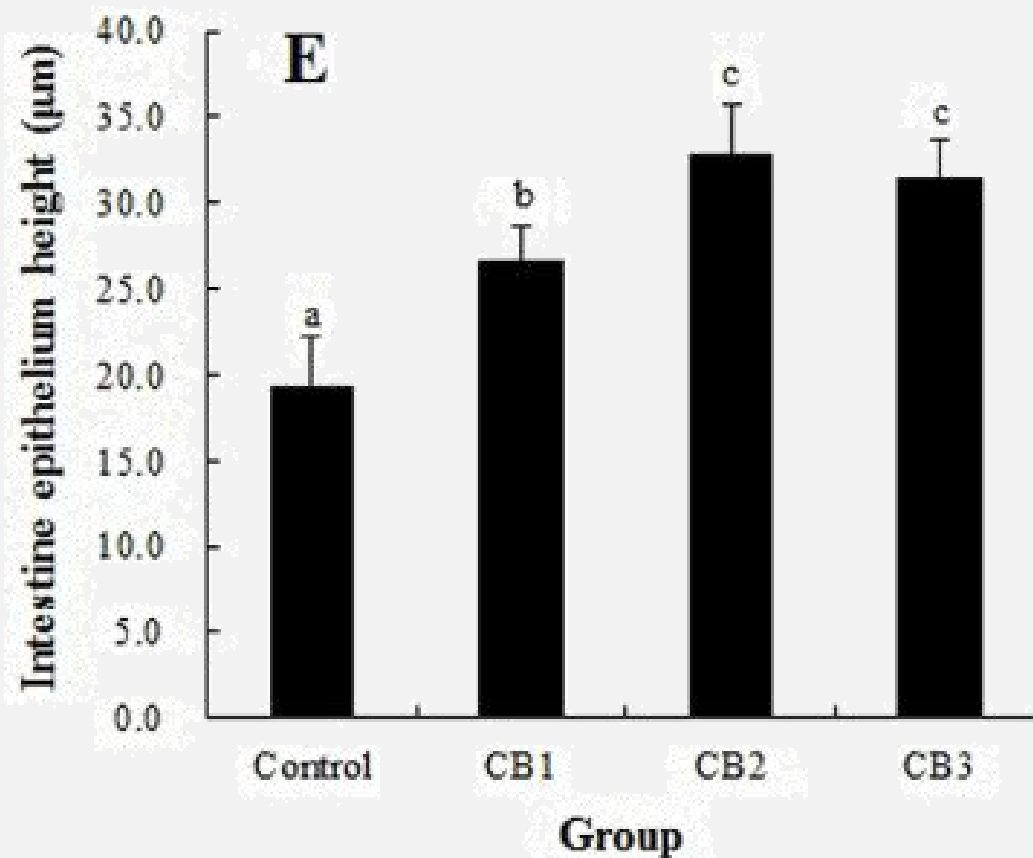
由图所示：实验56d后，三种浓度的丁酸梭菌对虾的生长性能均高于对照组，而虾的FCR均低于对照组。四组虾的存活率没有显著差异。

2.组织形态观察

与对照组（A）相比，三个实验组肠上皮连接紧密排列，微绒毛整齐密实，没有观察到肠上皮细胞或细胞损伤（B, C, D）等坏死迹象。

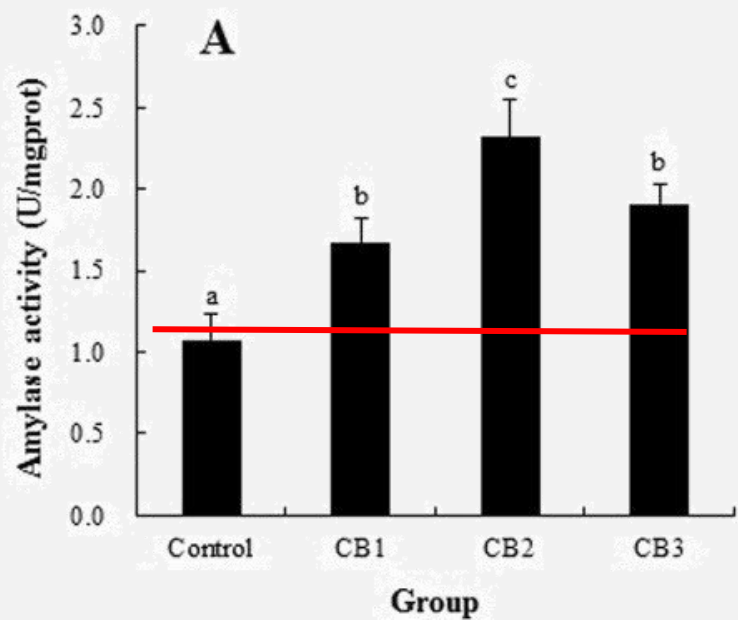


实验结果

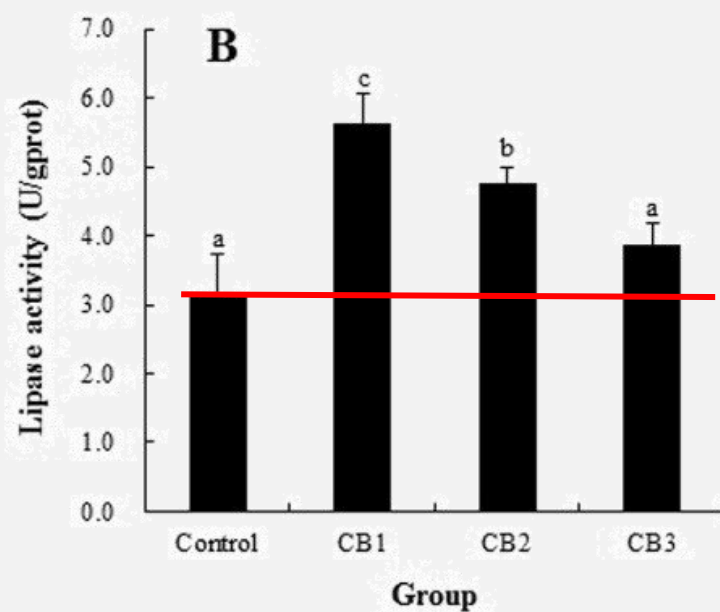


进行肠道绒毛高度统计分析得出：3个实验组肠道上皮细胞高度均增加，且CB2和CB3组高于CB1组，CB2和CB3组在统计学上没有显著差异。

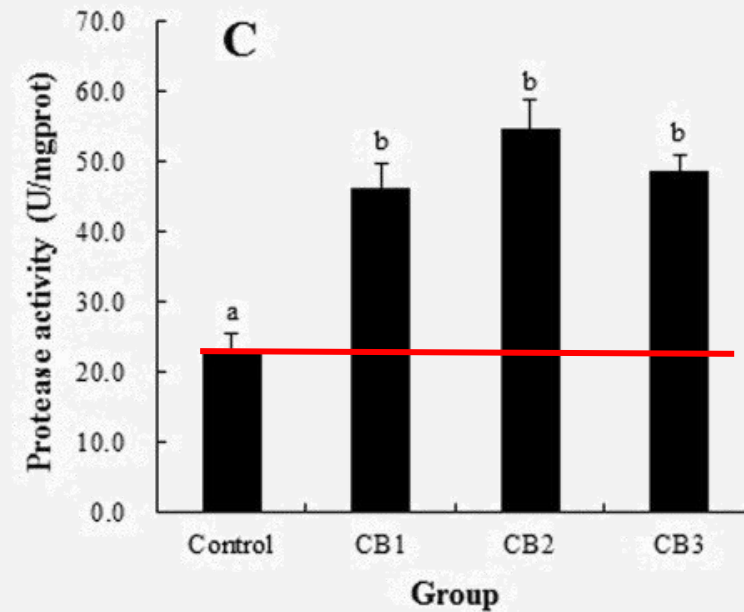
3. 肠道生化分析



淀粉酶



脂肪酶



蛋白酶

4.短链脂肪酸测定:

Table 3

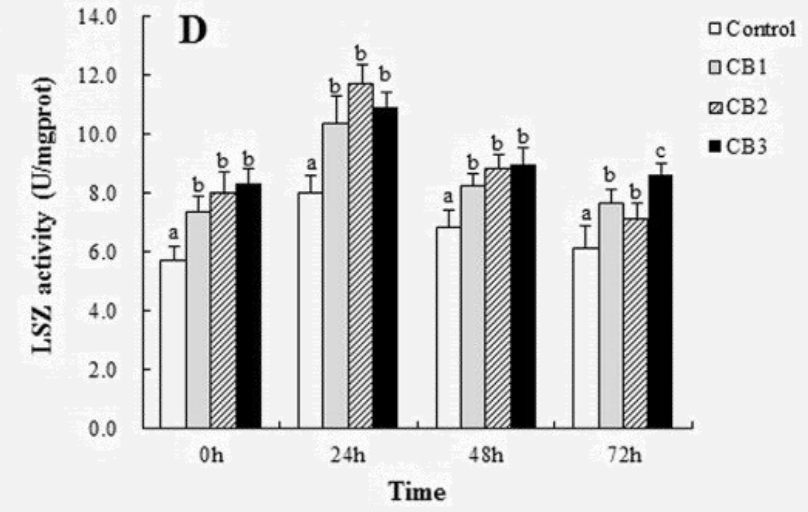
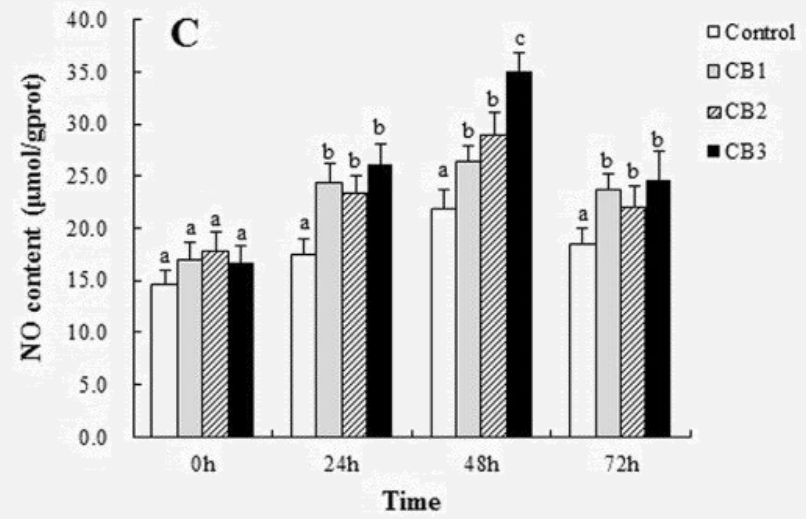
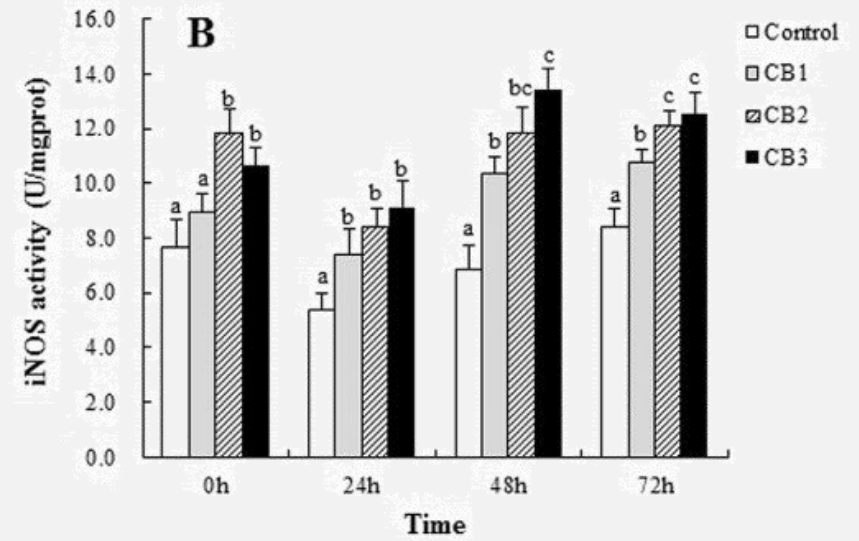
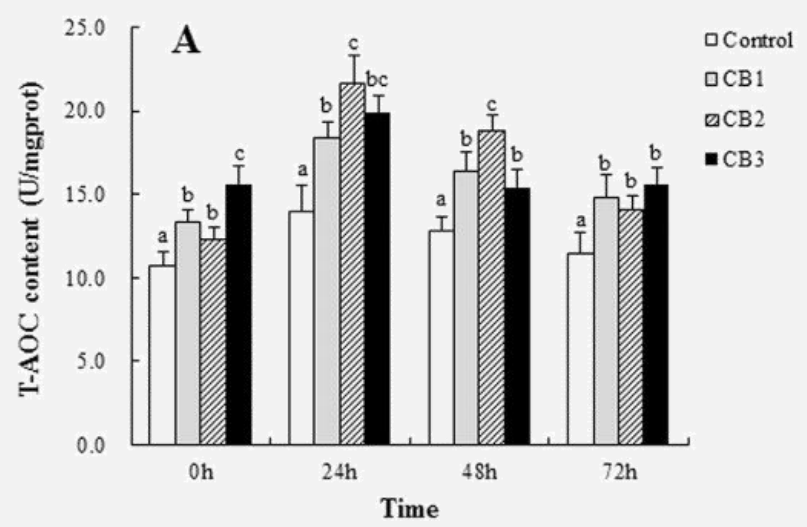
Intestinal SCFA content (mg/g) of *L. vannamei* fed the control diet and three *C. butyricum*-containing diets for 56 d.

Parameters	Control	CB1	CB2	CB3
Acetic acid	11.06 ± 0.23 ^a	12.51 ± 0.45 ^b	13.15 ± 0.34 ^b	15.04 ± 0.41 ^c
Propionic acid	1.15 ± 0.03 ^a	1.34 ± 0.06 ^b	1.45 ± 0.12 ^b	1.49 ± 0.23 ^b
Butyric acid	0.93 ± 0.06 ^a	1.27 ± 0.14 ^b	1.24 ± 0.08 ^b	1.36 ± 0.11 ^b

Vertical bars represented the mean ± SE ($N = 3$). Data indicated with different letters were significantly different ($P < 0.05$) among treatments.

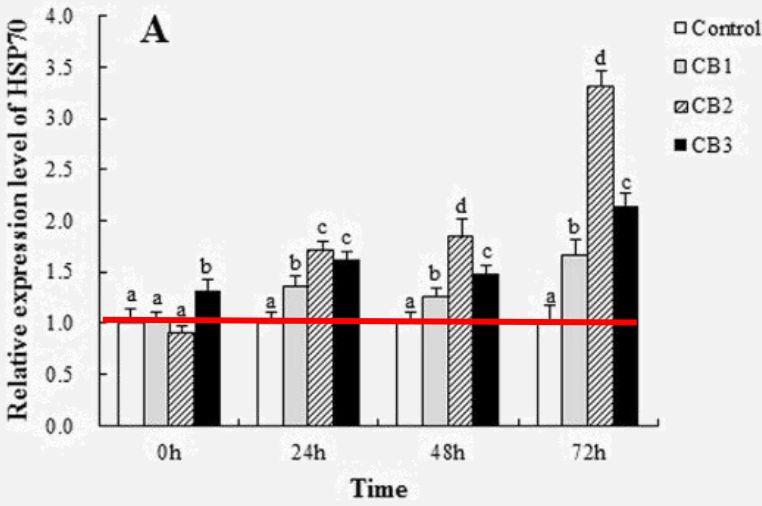
实验结果

5. 酶活性测定

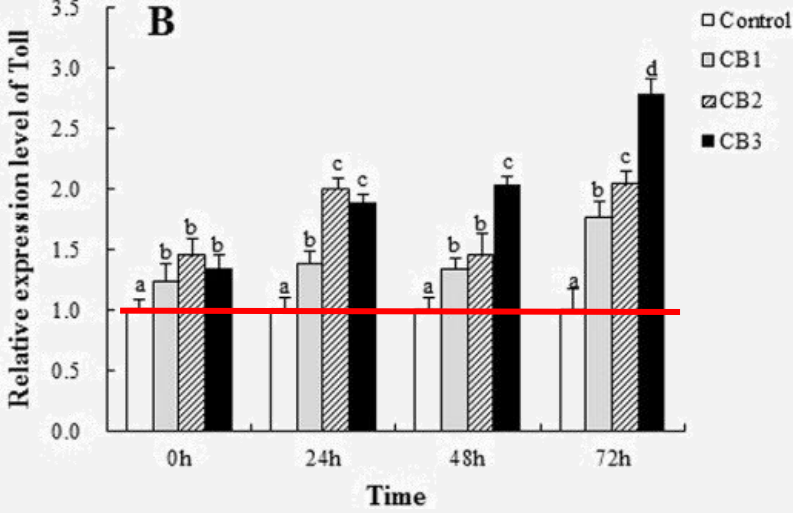


实验结果

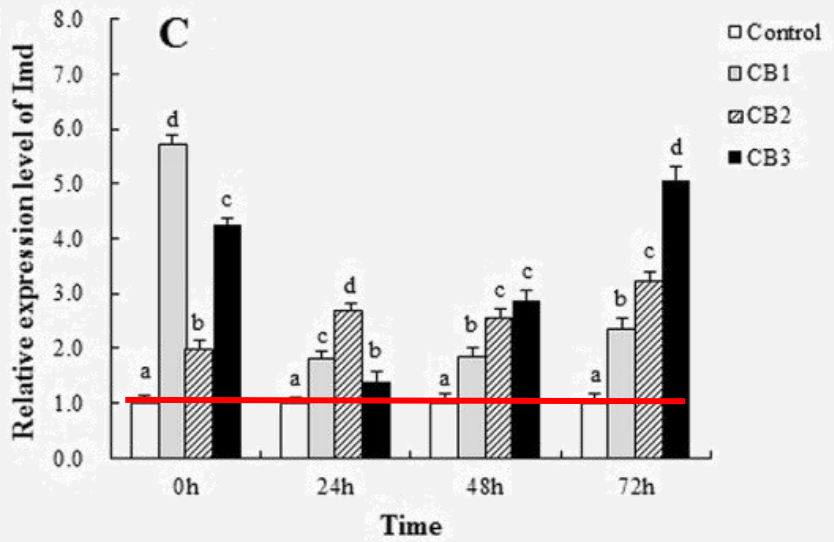
6. 荧光定量:



HSP 70



Toll



Imd

7.品质分析:

Table 4

Body composition (% wet weight basis) of the whole body of *L. vannamei* fed the control diet and three *C. butyricum*-containing diets for 56 d.

Parameters	Control	CB1	CB2	CB3
Moisture	72.32 ± 0.37 ^a	71.91 ± 0.61 ^a	73.20 ± 0.97 ^a	71.14 ± 1.67 ^a
Crude protein	20.40 ± 0.72 ^a	22.23 ± 0.20 ^b	22.25 ± 0.22 ^b	21.58 ± 0.51 ^b
Crude lipid	1.42 ± 0.05 ^b	1.37 ± 0.06 ^{ab}	1.31 ± 0.04 ^a	1.26 ± 0.05 ^a
Ash	1.61 ± 0.02 ^a	1.58 ± 0.03 ^a	1.56 ± 0.03 ^a	1.64 ± 0.03 ^a

Vertical bars represented the mean ± SE (N = 3). Data indicated with different letters were significantly different ($P < 0.05$) among treatments.

04

讨论分析

“察消长之往来，辨利害于疑似”

——苏轼

讨论分析

结果表明，丁酸梭菌改善虾的**生长**，可能是因为**增加了消化道酶活性和SCFAs含量**。

虾缺乏特异性免疫系统，而肠道中T-AOC可以防止的氨胁迫实验的有害作用并反映机体内的细胞内抗氧化防御状态。iNOS通路是一种重要的抗菌系统吞噬细胞，其负责产生NO自由基。HSP70是一种应激蛋白分子可以直接增加内源性过氧化物酶活性。

实验结果中肠道T-AOC含量，iNOS活性和HSP70基因表达增加，提示其保护作用其实是一种**适应性改善压力的耐受程度**。

讨论分析

溶菌酶在抵抗细菌侵袭中发挥着重要的作用。Toll和Imd通路中则可以通过控制不同细菌产生的抗菌肽分别对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌产生**主动免疫**。

SCFAs可以穿透细菌细胞壁，在中性细胞质中释放其质子（ H^+ ）并降低细胞内pH，最终导致**细胞生长停止甚至细胞死亡**，且可以**改善消化道酶的活性**，增强肠道的消化和吸收能力。

研究表明，丁酸梭菌增加肠道SCFAs含量以及溶菌酶活性，Toll和Imd的水平，有助于**增强虾肠道的免疫功能**。

The slide features a white background with several decorative elements. On the left, a large teal-outlined triangle contains a cityscape image of Chicago at sunset. To its right, a large teal-outlined triangle is empty. In the top right corner, there are overlapping teal and blue triangles. A vertical line of smaller teal and blue triangles descends from the top right. The text '请各位老师批评指正!' is centered in a bold teal font.

请各位老师批评指正!