

史文军, 王学江, 李 峰, 等. 饲料中添加褐藻寡糖对脊尾白虾免疫能力的影响[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(4): 698-710.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.04.014

饲料中添加褐藻寡糖对脊尾白虾免疫能力的影响

史文军^{1,2,3}, 王学江⁴, 李 峰⁴, 刘正一^{1,3}, 迟 艳⁴, 张志凯⁴, 黎 慧², 王李宝²,
孙 林¹, 万夕和², 秦 松^{1,3}

(1.中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003; 2.江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007; 3.中国科学院大学, 北京 100049; 4.五洲丰农业科技有限公司, 山东 烟台 264000)

摘要: 为了探究饲料中添加褐藻寡糖(AOS)对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)免疫和抵抗二尖梅奇酵母(*Metschnikowia bicuspidate*)能力的影响, 试验设置4个不同褐藻寡糖添加量处理, 分别为0 mg/kg(CK)、500 mg/kg(T1)、1 000 mg/kg(T2)和2 000 mg/kg(T3), 在相同条件下饲养60 d。结果表明: T2处理脊尾白虾的终末质量、总质量增长率和特定生长率极显著高于CK($P<0.01$); T3处理脊尾白虾存活率极显著高于CK($P<0.01$)。相较于CK, T2处理脊尾白虾肝胰腺中SOD活性、肝胰腺和肌肉中ACP活性、肝胰腺和肌肉中AKP活性、肝胰腺中PO活性均极显著提高($P<0.01$)。T1处理LGBP基因在脊尾白虾肝胰腺中相对表达量极显著高于CK($P<0.01$), T2处理SOD、LGBP基因在脊尾白虾肝胰腺中相对表达量均极显著高于CK($P<0.01$), 各处理LZM、SR和CTSB基因在脊尾白虾肝胰腺中相对表达量与CK均无显著差异($P>0.05$)。表明饲料中添加1 000 mg/kg褐藻寡糖可以有效提高脊尾白虾体内部分抗氧化和免疫相关基因的表达量, 提高脊尾白虾的抗氧化水平和免疫能力。基因相对表达量检测结果与酶活性检测结果一致。攻毒试验中, T1、T2和T3处理脊尾白虾存活率在第3~5 d均极显著高于CK($P<0.01$), 但各处理脊尾白虾最终存活率和CK相同, 表明褐藻寡糖对二尖梅奇酵母MQ2101具有一定的防控作用, 但并不能提高感染后的最终存活率。

关键词: 脊尾白虾; 褐藻寡糖; 二尖梅奇酵母; 免疫能力

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)04-0698-13

Effects of alginate oligosaccharides supplementation on immunity of *Exopalaemon carinicauda*

SHI Wen-jun^{1,2,3}, WANG Xue-jiang⁴, LI Feng⁴, LIU Zheng-yi^{1,3}, CHI Yan⁴, ZHANG Zhi-kai⁴,
LI Hui², WANG Li-bao², SUN Lin¹, WAN Xi-he², QIN Song^{1,3}

(1. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. Jiangsu Institute of Oceanology & Marine Fisheries, Nantong 226007, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Wuzhoufeng Agricultural Science & Technology Co., Ltd., Yantai 264000, China)

收稿日期: 2023-03-07

基金项目: 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201747); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(22)3083]; 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目[JBSG(2021)122]; 江苏现代农业产业技术体系资助项目[JATS(2022)419、JATS(2022)164]

作者简介: 史文军(1987-), 男, 安徽寿县人, 博士, 副研究员, 主要从事海水虾类品种选育和绿色健康养殖研究。(E-mail) muzhiye080326@126.com

通讯作者: 万夕和, (E-mail) wxh1708@163.com; 秦 松, (E-mail) sqin@yic.ac.cn

Abstract: In order to investigate the effects of alginate oligosaccharides (AOS) on the immunity and resistance of *Exopalaemon carinicauda* to *Metschnikowia bicuspidate*, four treatments were set up, the addition levels of AOS were 0 mg/kg (CK), 500 mg/kg (T1), 1 000 mg/kg (T2) and 2 000 mg/kg (T3), respectively. The

shrimps were fed under the same conditions for 60 days. The results showed that the terminal weight, total weight growth rate and specific growth rate of *Exopalaemon carinicauda* of T2 treatment were significantly higher than those of CK ($P < 0.01$), and the survival rate of *Exopalaemon carinicauda* of T3 treatment was significantly higher than that of CK ($P < 0.01$). Compared with CK, the *SOD* activity in hepatopancreas, *ACP* activity in hepatopancreas and muscles, *AKP* activity in hepatopancreas and muscles, and *PO* activity in hepatopancreas of *Exopalaemon carinicauda* of T2 treatment were significantly increased ($P < 0.01$). The relative expression level of *LGBP* in hepatopancreas of *Exopalaemon carinicauda* of T1 treatment was significantly higher than that of CK ($P < 0.01$). The relative expression levels of *SOD* and *LGBP* in hepatopancreas of *Exopalaemon carinicauda* of T2 treatment were significantly higher than those of CK ($P < 0.01$). The relative expression levels of *LZM*, *SR* and *CTSB* genes in hepatopancreas of *Exopalaemon carinicauda* were not significantly different from those of CK ($P > 0.05$). The results showed that the addition of 1 000 mg/kg alginate oligosaccharides in the diet could effectively increase the expression of some anti-oxidation and immune related genes, and enhance the anti-oxidation level and immune ability of *Exopalaemon carinicauda*. The results of relative gene expression were consistent with the results of enzyme activity detection. In the challenge experiment, the survival rate of *Exopalaemon carinicauda* in T1, T2 and T3 treatments was significantly higher than that in CK ($P < 0.01$) in 3–5 d. But the final survival rate of *Exopalaemon carinicauda* in each treatment was the same as that in CK, which indicated that alginate oligosaccharides could prevent and control *Metschnikowia bicuspidata* MQ2101, but could not improve the final survival rate after infection.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; alginate oligosaccharides; *Metschnikowia bicuspidata*; immunity

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)隶属于甲壳亚门(Crustacea)、十足目(Decapoda)、长臂虾科(Palaemonidae)、白虾属,又名小白虾、五须虾,是中国特有的经济虾类之一^[1]。由于其肉质细嫩、味道鲜美,生长速度快、繁殖能力强、适应性广,且具有较高的经济价值,在江苏沿海地区被快速推广养殖^[2],目前江苏省养殖面积和产量均居全国首位。然而近些年一种被当地养殖户称为“僵尸病”的新疾病在江苏省沿海脊尾白虾养殖区开始流行,本课题组前期已经开展了该病的流行病学和病原学研究,分离纯化出致病原,致病原鉴定为二尖梅奇酵母(*Metschnikowia bicuspidata*),命名为MQ2101^[3]。目前有关二尖梅奇酵母的致病机制及其在养殖环境中的感染传播途径、具体的防治措施都尚不明确。当脊尾白虾出现“僵尸病”典型症状时,已经进入感染后期,患病虾活动减少且不再摄食,这增加了该病的治疗难度。因此在脊尾白虾养殖过程中需要加强预防意识,深入贯彻防大于治的原则。

脊尾白虾属于无脊椎动物,不具有获得性免疫系统,主要依靠先天性免疫系统中的细胞免疫和体液免疫来抵抗外源病原体的侵染。细胞免疫主要是依靠血淋巴进行吞噬和包裹等一系列过程,血细胞中的半颗粒细胞主导包裹过程,颗粒细胞介导机体的凝集作用,同时它们也参与吞噬作

用^[4-5]。体液免疫主要包括抗氧化酶系统、酚氧化酶原激活系统和一些抗菌肽等^[6-8]。因此提高脊尾白虾先天性免疫能力是目前养殖生产中常用病害防治方法之一。

褐藻寡糖(Alginate oligosaccharides, AOS)是褐藻胶通过褐藻胶裂解酶降解得到的低分子聚合物,是一种无支链阴离子寡糖,由 β -D-甘露糖醛酸(M)和 α -L-古洛糖醛酸(G)(比例2:1)构成,其相对分子质量一般低于 2×10^3 ^[9-11]。褐藻寡糖具有溶解性好、稳定性强、易被吸收、安全无毒和多种生物活性等特点,被广泛应用于生物、医药、食品和农业等方面^[12-14]。研究发现褐藻寡糖具有良好的免疫调节活性,适宜的摄入量可以提高水产动物机体免疫能力。在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的日粮中添加适量含量的褐藻寡糖可以显著提高其体内溶菌酶(*LZM*)、碱性磷酸酶(*AKP*)、谷丙转氨酶(*ALT*)、谷草转氨酶(*AST*)、超氧化物歧化酶(*SOD*)、过氧化氢酶(*CAT*)和谷胱甘肽过氧化物酶(*GSH-Px*)的活性,从而提高抗氧化性能增强草鱼的非特异性免疫能力^[15-17]。在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)饲料中添加褐藻寡糖可以显著增加大菱鲆血液中白细胞数量和酸性磷酸酶(*ACP*)活性,进而提高大菱鲆的非特异性免疫能力^[18-20]。在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和石斑鱼的日粮中添加褐藻寡糖可以显著提高大黄鱼血清中的*CAT*

和 *LZM* 活性与石斑鱼血清中 *CAT*、*ACP*、*AKP* 和 *LZM* 的活性,从而提高大黄鱼和石斑鱼的免疫能力^[14]。褐藻寡糖投喂刺参 (*Apostichopus japonicus*) 可以显著提高其体腔液和体壁中 *ACP*、*AKP*、*LZM* 和过氧化物酶 (*POD*) 活性,从而提高刺参的非特异性免疫能力^[21]。

为了探究褐藻寡糖增强脊尾白虾免疫能力的效果及防控“僵尸病”的可行性,本研究给脊尾白虾饲喂不同含量褐藻寡糖的日粮,在相同条件下饲养脊尾白虾 60 d 后,统计和观察各处理脊尾白虾生长性能、组织超微结构、免疫酶活性、免疫基因表达,并通过二尖梅奇酵母 MQ2101 攻毒试验检测各处理脊尾白虾对二尖梅奇酵母 MQ2101 的抗性,以评价日粮中添加褐藻寡糖对脊尾白虾免疫能力的影响。本研究为褐藻寡糖在脊尾白虾免疫调节和防控“僵尸病”方面的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究试验用褐藻寡糖来自五洲丰农业科技有限公司;二尖梅奇酵母 MQ2101 来自本实验室分离保存的菌株;总蛋白质 (TP) 含量、*SOD* 活性、酚氧化酶 (*PO*) 活性、*ACP* 活性、*AKP* 活性以及 *LZM* 活性检测试剂盒购自南京建成科技有限公司。

在江苏省海洋水产研究所江苏省脊尾白虾良种场养殖池塘内用地笼收集 5 kg 种虾,运回养殖车间,于室内水泥池中暂养稳定 2 d 后,从中挑选规格一致的雌虾 [(5.0±0.2) cm] 和雄虾 [(4.0±0.2) cm],活力好、无损伤、且性腺发育同步的种虾 250 尾 (雌雄比 3:1),转移至 1 000 L 圆形塑料桶中。在温度 (25±1) °C,盐度 25±1,溶解氧 (7.8±0.5) mg/L, pH 8.1±0.2 条件下继续饲养,期间用鲜活沙蚕和四角蛤蜊肉投喂进行营养强化,每天分 3 次投喂,时间分别为 7:00、18:00、21:00,其中后 2 次的投喂量占投喂总量的 80%。每天换水 1/3,并及时清理残饵、粪便和死虾等污染物。

挑选受精卵快孵化的抱卵雌虾 50 尾,转入 1 000 L 圆形孵化桶中饲养,用灯光引诱的方法收集刚孵化的脊尾白虾幼体,经计数后,随机选取 20 000 尾刚孵化的幼体转入 2 个 500 L 圆形塑料桶中,培养 7 d,然后再转入 2 个 1 000 L 圆形塑料桶中,继续培育 14 d 后获得试验用脊尾白虾。脊

尾白虾幼体培养条件为温度 (26±1) °C,盐度 25±1,溶解氧 (7.8±0.5) mg/L, pH 8.1±0.2,饵料主要为刚孵化的丰年虫无节幼体,每天投喂 4 次。每天换水量为 50%,并及时清理残饵、粪便和死虾等污染物。

1.2 脊尾白虾褐藻寡糖添加饲料的制备

选取粒径 0.8 mm 不含褐藻寡糖的南美白对虾配合饲料 (南通海大生物科技有限公司产品) 作为基础饲料,其主要营养成分为粗蛋白质 42.67%、粗脂肪 6.15%、钙 2.27%、磷 1.59%、盐分 1.18%、赖氨酸 2.45%、蛋氨酸 0.71% 和苏氨酸 1.66% 等。将 0 g、0.5 g、1.0 g 和 2.0 g 的褐藻寡糖分别充分溶于 150 ml 超纯水中,然后分别与 999.9 g、999.4 g、998.9 g 和 997.9 g 基础饲料充分混合,再用溶解有 0.1 g 水产专用黏合剂的 100 ml 水溶液进行充分黏合,制备成 0 mg/kg、500 mg/kg、1 000 mg/kg 和 2 000 mg/kg 4 个不同褐藻寡糖添加量的试验用饲料,−20 °C 冷冻保存,使用期限为 30 d。

1.3 不同含量褐藻寡糖添加饲料的投喂试验

选取规格大小基本一致培育 21 d 的仔虾,从中随机挑选 30 尾,再随机分为 3 组,每组 10 尾,经吸水纸充分擦干体表水分后,用千分之一的天平称量每组虾的质量,再计算平均每尾虾的初始质量。

从上述挑选的规格一致的虾中随机选取 200 尾虾,放入 500 L 圆柱形塑料桶中。试验分为饲料中 0 mg/kg 褐藻寡糖处理即对照 (CK)、500 mg/kg 褐藻寡糖处理 (T1)、1 000 mg/kg 褐藻寡糖处理 (T2) 和 2 000 mg/kg 褐藻寡糖处理 (T3) 4 个处理,每个处理设置 3 桶为 3 个生物学重复。饲养条件为温度 (25±1) °C,盐度 25±1,溶解氧 (7.8±0.5) mg/L, pH 8.1±0.2,早 6 点、晚 6 点各投喂 1 次,每天及时调整投喂量,以保证所有虾均处于饱食状态,期间每日换水 30%~50%,及时清理残饵、粪便和死虾等污染物,试验周期持续 60 d。

1.4 生长参数测定

统计各试验桶中存活虾的个数。从各试验桶中随机挑选 30 尾存活虾,立即放在冰水中麻醉,用吸水纸充分擦干体表水分后,称量每尾虾的质量,计算各试验组平均每尾虾的最终质量。存活率 (*SR*)、特定生长率 (*SGR*) 和总质量增长率 (*TWG*) 计算公式如下:

$$SR = N_t / N_0 \times 100\%$$
$$SGR = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$$
$$TWG = (TW_t - TW_0) / TW_0 \times 100\%$$

式中, N_t 表示试验结束时试验虾存活数量; N_0 表示试验开始时试验虾存活数量; W_t 表示试验结束时虾的质量; W_0 表示试验开始时虾的质量; t 表示试验持续时间; TW_t 表示试验结束时虾的总质量; TW_0 表示试验开始时虾的总质量。

1.5 试验样品采集

从各试验桶中随机挑选 1 尾虾,经冰水麻醉后,取其肝胰腺、肌肉、肠和鳃用 2.5%戊二醛(电镜专用)固定后,用于后续透射电镜观察。

从各试验桶中随机挑选 5 尾活虾,经冰水麻醉后,用酒精棉球擦拭体表,取其肝胰腺和肌肉分别混合,迅速置于液氮中速冻后保存于-80℃冰箱用于后续测定相关免疫酶活性。再从各试验桶中随机挑选 5 尾活虾,经冰水麻醉后,用酒精棉球擦拭体表,取其肝胰腺和肌肉分别混合,迅速置于液氮中速冻后保存于-80℃冰箱用于后续测定相关免疫基因表达情况。

1.6 透射电镜观察

取经 2.5%戊二醛(电镜专用)固定的各试验组脊尾白虾肝胰腺、肌肉、肠和鳃组织样品,磷酸漂洗液漂洗 3 次,1%锇酸 4℃固定 2 h;ddH₂O 漂洗 3 次后,分别用浓度梯度为 30%、50%、70%、80%、95%、100%的乙醇溶液脱水 2 次,每次 15 min,在环氧丙烷中过渡,812 树脂梯度渗透后包埋,60℃聚合,包埋块用 Leica UC7 型超薄切片机进行半薄定位及超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色切片,用透射电镜观察组织超微结构。

1.7 免疫酶活性测定

取肝胰腺和肌肉样品分别称质量,按照 1:9 (g/ml)的比例加入经 4℃过夜预冷的 0.86%生理盐水,高速振荡研磨制备 10%组织匀浆液,将制备好的匀浆液于 4℃、2 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液置于冰上,先测定总蛋白质(TP)含量,然后用 0.86%生理盐水稀释至适宜的浓度后,根据各酶活性检测试剂盒说明书中的方法测定脊尾白虾肝胰腺和肌肉中的 *SOD*、*PO*、*ACP*、*AKP* 和 *LZM* 活性。

1.8 免疫基因表达量测定

使用 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司产品),

根据说明书中的方法分别提取脊尾白虾肝胰腺和肌肉中的总 RNA,用安捷伦 2100 微量紫外分光光度计(美国 Agilent Technologies 公司产品)和琼脂糖凝胶电泳(无 RNA 酶)评估 RNA 质量。使用 Oligo(dT)磁珠富集 mRNA,用裂解缓冲液裂解 mRNA,随后使用 Prime Script RT reagent Kit(中国 TaKaRa 公司产品)反转录合成 cDNA。

以脊尾白虾 18S rRNA 作为内参,检测 8 个脊尾白虾免疫相关基因的表达量,引物采用 AlleleID 软件(v 6.0)设计,所检测基因及引物序列如表 1 所示。

使用 TBGreen Premix Ex Taq™ 试剂盒(中国 TaKaRa 公司产品),按照说明书中的方法进行定量分析,基因相对表达量采用 2^{-ΔΔC_t}方法表示。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因及内参	编码的蛋白质	引物序列(5'→3')
<i>SOD</i>	超氧化物歧化酶	F:CTCTCCTTGGAATTGGATGTGTG R:TGCGGGCGCTTTTCGTAG
<i>proPO</i>	酚氧化酶原	F:AAACGATTTCGACTACCATCTCCA R:GTTTCATTCGGTTTCCCTCTC
<i>LZM</i>	溶菌酶	F:TGAACCTGCTACTGTGCTGGA R:GTTGATGGCTTCCGTGTTG
<i>ALF</i>	抗脂多糖因子	F:GGTTCATCTGCTGCTCCTG R:GAGCCCCATAATCCCAAT
<i>LGBP</i>	脂多糖-β-1,3-葡聚糖结合蛋白	F:ATTTGGATGTTGCCAGAAA R:AAGTCCCCAGTGAAGTGTG
<i>SR</i>	清道夫受体	F:CAAACACAGGCCTCACATTC R:ACCCAGAGGACTGGAAGGAT
<i>CTSB</i>	组织蛋白酶 B	F:TAATACTGGGTGTGCTGTGTG R:TACTTTGAGTCGGGATGAACG
<i>CTL</i>	C 型凝集素	F:CAATACGACAGTCTGGGCTTC R:CGCACCTCCATCAACATCAG
18S rRNA	核糖体小 rRNA	F:ACCTATCCTGAGTGCCTAAGC R:CTTCGTCTCTCCATCTTCTGC

1.9 二尖梅奇酵母 MQ2101 攻毒试验

从上述各试验桶中随机挑选 20 尾存活虾分别转入事先准备好的 100 L 圆形塑料桶中,稳定 2 d,稳定条件为温度由(25±1)℃逐步降至(18±1)℃并保持,盐度 25±1,溶解氧(7.8±0.5) mg/L, pH 8.1±0.2。管理方法同材料与方法 1.3 中的方法。

攻毒开始前 MQ2101 先在 PDA 平板上活化 3 次,再接种于 PDB 培养基中,于摇床中 28℃、150 r/min 培养 36 h,在 4℃、3 000 r/min 的条件下离心

5 min,弃上清,用无菌生理盐水重悬清洗 3 次,经计数后用无菌生理盐水稀释至 1.0×10^6 CFU/ml,获得菌体使用液。每只虾肌肉注射 $10 \mu\text{l}$ MQ2101 菌液。注射后正常饲养,并观察各组中虾的状态,及时捞出死虾,统计 7 d 攻毒存活率。

1.10 数据计算与统计分析

试验数据用平均值 \pm 标准差表示($n=3$),试验数据用 Origin 8.1、GraphPad Prism 8 和 SPSS 24.0 软件进行统计分析,检验组间差异, $P<0.05$ 为差异显著。

表 2 饲料中添加褐藻寡糖对脊尾白虾生长性能的影响

Table 2 Effects of alginate oligosaccharides on growth performance of *Exopalaemon carinicauda*

生长性能指标	CK	T1	T2	T3
初始体质量(g)	0.044 \pm 0.002Aa	0.044 \pm 0.002Aa	0.044 \pm 0.002Aa	0.044 \pm 0.002Aa
终末体质量(g)	0.51 \pm 0.02Bb	0.56 \pm 0.05ABab	0.59 \pm 0.01Aa	0.54 \pm 0.05ABab
存活率(%)	53.50 \pm 1.00BCbc	52.67 \pm 1.26Cc	56.00 \pm 1.50Bb	59.17 \pm 0.58Aa
总质量增长率(%)	525.47 \pm 14.03Bb	572.99 \pm 70.30ABab	648.27 \pm 38.57Aa	630.28 \pm 78.83ABab
特定生长率(%)	4.10 \pm 0.07Bb	4.24 \pm 0.14ABab	4.32 \pm 0.12Aa	4.18 \pm 0.16ABab

CK:0 mg/kg褐藻寡糖处理对照;T1:500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。同一行数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。同一行数据后不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

2.2 透射电镜观察结果

通过透射电镜观察各处理脊尾白虾不同组织超微结构变化情况,结果如图 1 所示,各处理脊尾白虾肝胰腺中细胞排列整齐、结构清晰、无明显的空泡和病变;肌肉中肌纤维完整呈弯曲状、无断裂和溶解现象;肠中肠绒毛清晰可见、排列紧密,肠壁中细胞排列整齐、结构清晰、无明显病变;鳃中鳃轴和鳃丝完整、细胞排列整齐,无破裂现象,细胞内各细胞器清晰。说明 CK 和 T1、T2、T3 处理脊尾白虾各组织超微结构基本一致,即在本试验添加量下褐藻寡糖对脊尾白虾是安全且无毒副作用的。

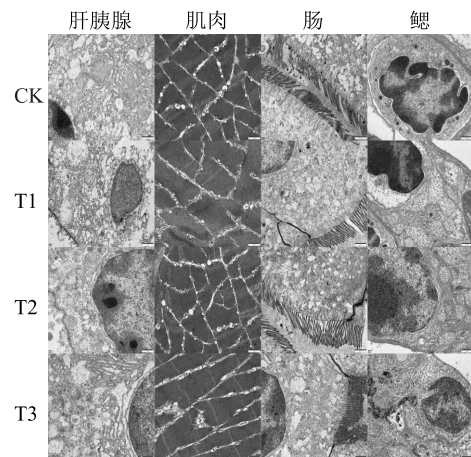
2.3 免疫酶活性

如图 2 所示,T2 和 T3 处理脊尾白虾肝胰腺中 SOD 活性极显著高于 CK ($P<0.01$),T1 处理脊尾白虾肝胰腺中 SOD 活性显著高于 CK ($P<0.05$);T3 处理脊尾白虾肌肉中 SOD 活性极显著高于 CK ($P<0.01$),T1 和 T2 处理脊尾白虾肌肉中 SOD 活性显著高于 CK ($P<0.05$),说明 3 种添加量的褐藻寡糖对脊尾白虾肝胰腺和肌肉中 SOD 活性起到增强的效果。如图 3 所示,T1、T2 和 T3 处理脊尾白虾肝胰腺中 ACP 活性极显著高于 CK ($P<0.01$);T2 和 T3

2 结果与分析

2.1 生长表现

各处理脊尾白虾生长性能如表 2 所示,T2 处理脊尾白虾终末体质量、总质量增长率、特定生长率均极显著高于 CK ($P<0.01$)。T3 处理脊尾白虾存活率极显著高于 CK 及其他处理($P<0.01$)。说明饲料中添加 1 000 mg/kg褐藻寡糖对脊尾白虾的生长性能具有显著增强效果,而 2 000 mg/kg 褐藻寡糖的添加可以显著提高脊尾白虾存活率。



CK:0 mg/kg褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。

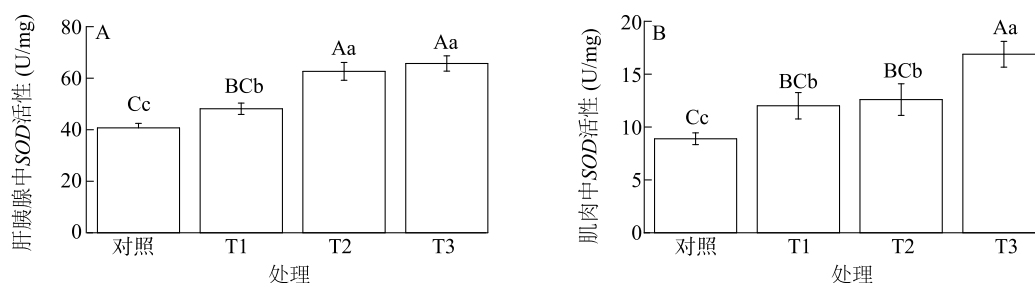
图 1 透射电镜观察结果($\times 5\ 000$)

Fig.1 Observation results of transmission electron microscope ($\times 5\ 000$)

处理脊尾白虾肌肉中 ACP 活性极显著高于 CK ($P<0.01$),T1 处理脊尾白虾肌肉中 ACP 活性显著高于 CK ($P<0.05$),说明 3 种添加量的褐藻寡糖对脊尾白虾肝胰腺和肌肉中 ACP 活性起到增强的效果。

图4结果显示,T2处理脊尾白虾肝胰腺中AKP活性显著高于CK ($P<0.05$),T1和T3处理脊尾白虾肝胰腺中AKP活性与CK无显著性差异($P>0.05$);T2和T3处理脊尾白虾肌肉中AKP活性极显著高于CK ($P<0.01$),T1处理脊尾白虾肌肉中AKP活性显著高于CK ($P<0.05$),说明饲料中添加褐藻寡糖对脊尾白虾AKP活性可以起到增强效果,但这种增强

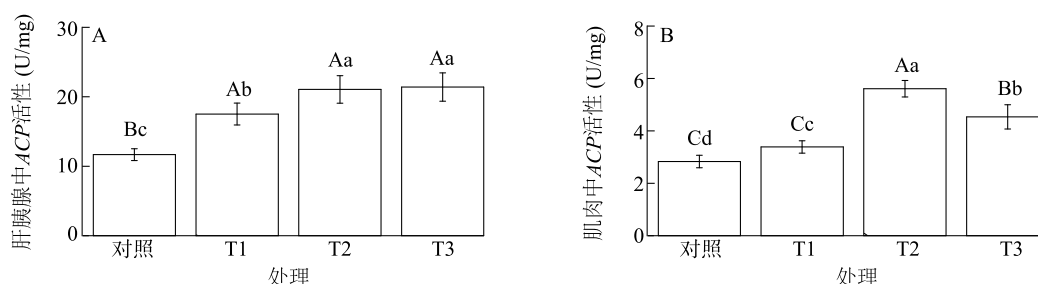
效果存在组织间差异性。图5结果显示,T1、T2和T3处理对脊尾白虾LZM活性不具有增强效果。图6结果表明,T2和T3处理脊尾白虾肝胰腺中PO活性极显著高于CK ($P<0.01$);T3处理脊尾白虾肌肉中PO活性极显著高于CK ($P<0.01$),说明提高饲料中褐藻寡糖含量可以显著提高脊尾白虾PO的活性。



CK;0 mg/kg褐藻寡糖对照;T1;500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2;1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3;2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

图2 肝胰腺(A)和肌肉(B)中SOD活性

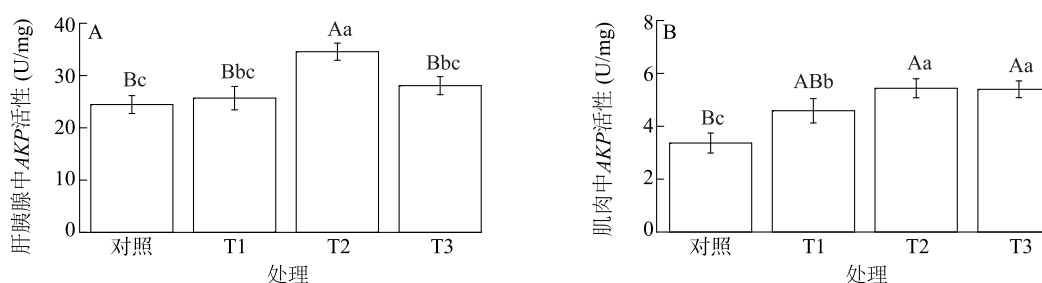
Fig.2 Superoxide dismutase (SOD) activity in hepatopancreas (A) and muscles (B)



CK;0 mg/kg褐藻寡糖对照;T1;500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2;1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3;2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

图3 肝胰腺(A)和肌肉(B)中ACP活性

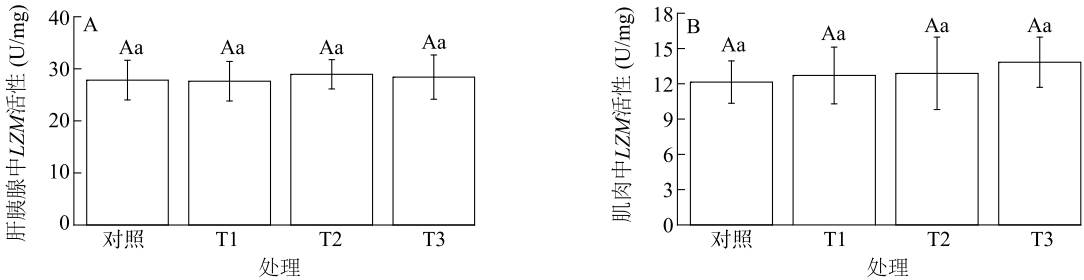
Fig.3 Acid phosphatase (ACP) activity in hepatopancreas (A) and muscles (B)



CK;0 mg/kg褐藻寡糖对照;T1;500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2;1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3;2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

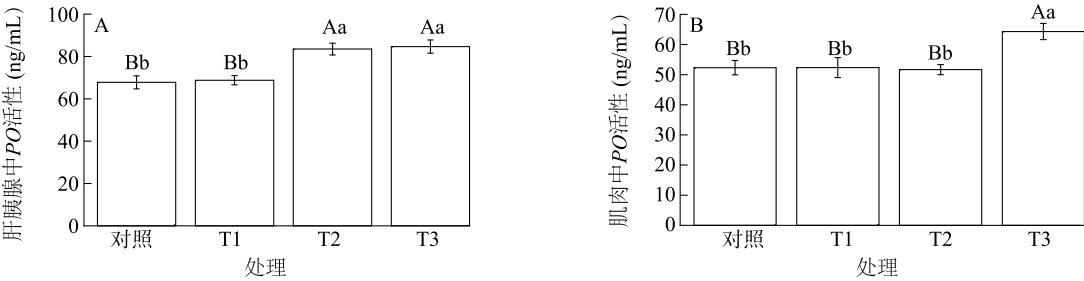
图4 肝胰腺(A)和肌肉(B)中AKP活性

Fig.4 Alkaline phosphatase (AKP) activity in hepatopancreas (A) and muscles (B)



CK:0 mg/kg褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

图5 肝胰腺(A)和肌肉(B)中LZM活性
Fig.5 Lysozyme (LZM) activity in hepatopancreas (A) and muscles (B)



CK:0 mg/kg褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

图6 肝胰腺(A)和肌肉(B)中PO活性
Fig.6 Phenoloxidase (PO) activity in hepatopancreas (A) and muscles (B)

2.4 免疫基因相对表达量

脊尾白虾肝胰腺和肌肉中各免疫基因表达检出结果如表3所示,ALF基因在2种组织中均未表达,SOD、proPO、LZM、CTSB和CTL基因在2种组织中均表达,LGBP、SR仅在肝胰腺中表达,说明这些免疫基因在不同组织中的表达存在差异。

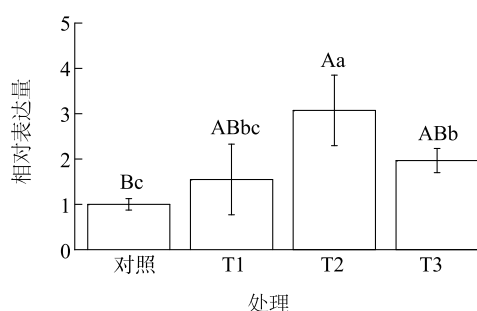
表3 肝胰腺和肌肉中各免疫基因检出结果
Table 3 Detection results of immune genes in hepatopancreas and muscles

基因	表达情况	
	肝胰腺	肌肉
SOD	+	+
proPO	+	+
LZM	+	+
ALF	-	-
LGBP	+	-
SR	+	-
CTSB	+	+
CTL	+	+

+表示免疫基因表达;-表示免疫基因未表达。

如图7所示,T2处理脊尾白虾肝胰腺中SOD基因的相对表达量极显著高于CK($P<0.01$),T3处理肝胰腺中SOD基因的相对表达量显著高于CK($P<0.05$),说明饲料中添加褐藻寡糖可以提高脊尾白虾的抗氧化能力。图8结果显示,T1和T2处理肝胰腺中proPO基因的相对表达量与CK无显著差异($P>0.05$),而T3处理肝胰腺中proPO基因的相对表达量显著高于CK($P<0.05$),说明饲料中添加褐藻寡糖可以提高脊尾白虾proPO基因的表达量,提高其机体免疫能力,但可能存在一定的剂量依赖性。图9、图10和图11结果显示,T1、T2和T3处理脊尾白虾肝胰腺中LZM、SR、CTSB基因以及肌肉中CTSB基因的相对表达量与CK无显著差异($P>0.05$),说明饲料中3种含量褐藻寡糖的添加对脊尾白虾中LZM、SR、CTSB这3个免疫基因的表达不具有增强效果。图12结果显示,T1、T2处理肝胰腺中LGBP基因的相对表达量极显著高于CK($P<0.01$),T3处理肝胰腺中LGBP基因的相对表达量显著高于CK($P<0.05$),说明饲料中添加褐藻寡糖

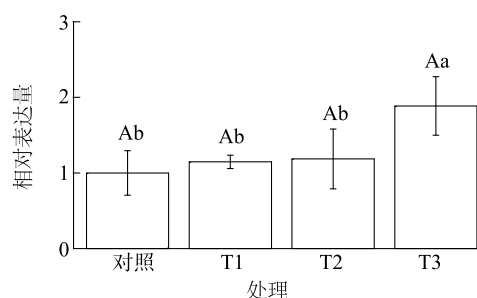
可以提高脊尾白虾 *LGBP* 基因的表达式,提高其机体免疫能力。图 13 显示 T1 处理肝胰腺中 *CTL* 基因的相对表达量极显著高于 CK ($P<0.01$)、T2 和 T3 处理肝胰腺中 *CTL* 基因的相对表达量显著高于 CK ($P<0.05$),肌肉中 *CTL* 基因的相对表达量与 CK 均无显著差异 ($P>0.05$),说明饲料中添加褐藻寡糖可以提高 *CTL* 的表达量,但可能存在组织差异性。



CK:0 mg/kg 褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg 褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg 褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg 褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

图7 肝胰腺中 *SOD* 基因相对表达量

Fig.7 Relative expression of *SOD* gene in hepatopancreas



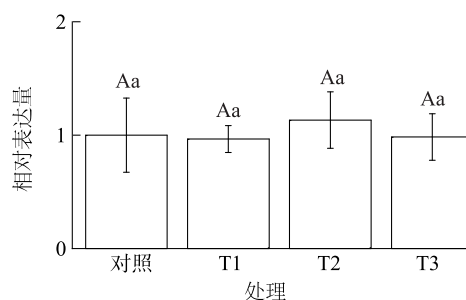
CK:0 mg/kg 褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg 褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg 褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg 褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

图8 肝胰腺中 *proPO* 基因相对表达量

Fig.8 Relative expression of *proPO* gene in hepatopancreas

2.5 二尖梅奇酵母攻毒试验结果

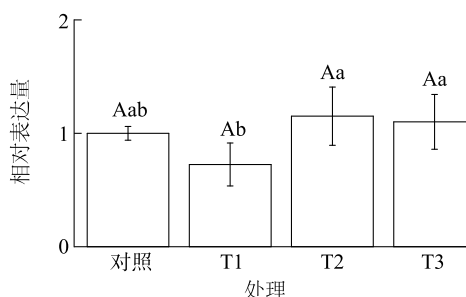
各处理脊尾白虾人工注射二尖梅奇酵母 MQ2101 后脊尾白虾的存活率如图 14 所示,试验结果显示,CK 的脊尾白虾感染后 1 d 就开始出现死亡,此时 T1、T2 和 T3 处理的脊尾白虾几乎无死亡。各处理的脊尾白虾感染后 2 d 均出现死亡,且此时



CK:0 mg/kg 褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg 褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg 褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg 褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

图9 肝胰腺中 *LZM* 基因相对表达量

Fig.9 Relative expression of *LZM* gene in hepatopancreas



CK:0 mg/kg 褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg 褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg 褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg 褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

图10 肝胰腺中 *SR* 基因相对表达量

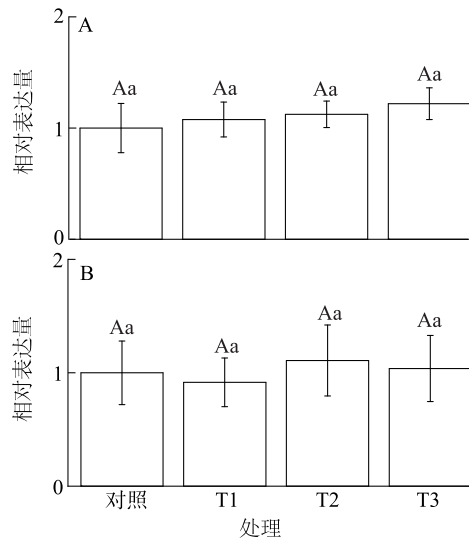
Fig.10 Relative expression of *SR* gene in hepatopancreas

脊尾白虾摄食减少、活力减弱。感染3~5 d, T1、T2 和 T3 处理的脊尾白虾存活率均显著高于 CK ($P<0.05$),且 CK 在第 3 d 死亡率达到 50%,而 T1、T2 和 T3 处理的脊尾白虾在第 5 d 死亡率才达到 50%;第6~7 d 各处理的脊尾白虾存活率无显著差异 ($P>0.05$),第 7 d CK 和各处理存活率均接近 10%。说明饲料中添加褐藻寡糖可以短期内提高脊尾白虾对 MQ2101 的抗性,但不能提高感染后的最终存活率。

3 讨论

3.1 饲料中添加褐藻寡糖对脊尾白虾生长的影响

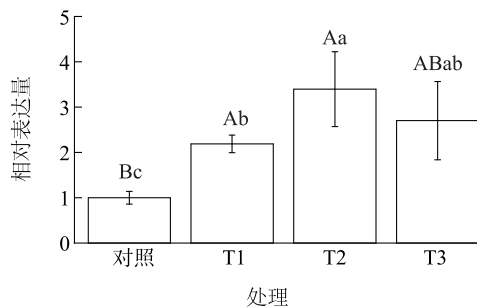
饲料中添加适量的褐藻寡糖对水产动物的肠道具有很好的调节作用,有助于其生长性能的提高。Hu 等^[17]发现饲料中添加褐藻寡糖可以显著提高草鱼的存活率、增质量率和特异生长率。Yang 等^[16]



CK;0 mg/kg褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

图 11 肝胰腺(A)和肌肉(B)中 CTSE 基因相对表达量

Fig.11 Relative expression of CTSE gene in hepatopancreas (A) and muscles (B)

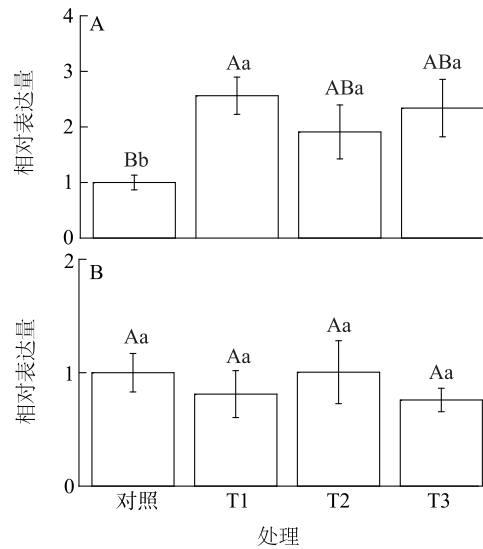


CK;0 mg/kg褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

图 12 肝胰腺中 LGBP 基因相对表达量

Fig.12 Relative expression of LGBP gene in hepatopancreas

的研究结果也表明饲料中添加褐藻寡糖可以显著提高草鱼的生长性能,但这种作用存在剂量依赖性。Ashouri 等^[22]发现饲料中添加褐藻寡糖可以显著提高尖嘴鲈鱼(*Lates calcarifer*)体内胰蛋白酶、脂肪酶和 α -淀粉酶的活性,这说明饲料中添加褐藻寡糖可以提高尖嘴鲈鱼的消化能力,对其生长性能的提高是有意义的。潘金露等^[23]研究结果也表明饲料中



CK;0 mg/kg褐藻寡糖对照;T1:500 mg/kg褐藻寡糖处理;T2:1 000 mg/kg褐藻寡糖处理;T3:2 000 mg/kg褐藻寡糖处理。图柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。图柱上不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

图 13 肝胰腺(A)和肌肉(B)中 CTL 基因相对表达量

Fig.13 Relative expression of CTL gene in hepatopancreas (A) and muscles (B)

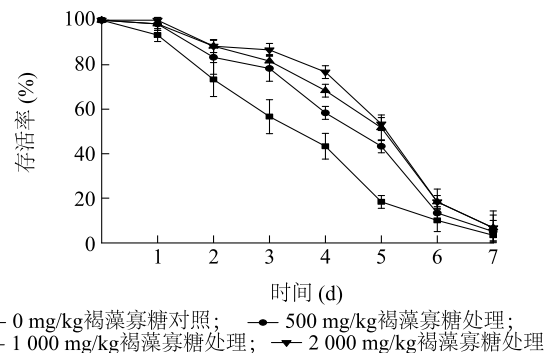


图 14 饲料中添加褐藻寡糖各处理脊尾白虾攻毒试验后存活率

Fig.14 Survival rate of *Exopalaemon carinicauda* after challenge experiment in the treatments of adding alginate oligosaccharides in the diet

添加褐藻寡糖可以提高大菱鲂脂肪酶的活性。而霍圃宇等^[19]发现饲料中添加褐藻寡糖对大菱鲂幼鱼的生长无显著提高效果。本研究 T2 处理脊尾白虾的终末质量、总质量增长率和特定生长率极显著高于 CK ($P<0.01$),说明饲料中添加1 000 mg/kg褐藻寡糖对脊尾白虾生长性能具有显著提高作用;而 T3 处理脊尾白虾生长性能与 CK 无显著差异($P>0.05$),但存活率极显著高于 CK ($P<0.01$),说明饲

料中添加2 000 mg/kg褐藻寡糖对脊尾白虾的生长可能不具有调节作用,但可以提高虾体对外界环境变化的抵抗力。

3.2 饲料中添加褐藻寡糖对脊尾白虾免疫酶活性的影响

病原侵入后会导致机体产生过量的活性氧(Reactive oxygen species, ROS),造成蛋白质等生物大分子损伤,引起生理机能的改变^[24]。甲壳动物的抗氧化防御系统酶能够清除机体内过量的活性氧,从而维持机体的稳态^[25]。*SOD*是甲壳动物抗氧化防御系统酶中重要的成员之一,在清除多余的氧自由基与防止细胞损伤方面起着重要作用,是衡量甲壳类动物抗氧化系统状况的重要指标^[26]。*AKP*和*ACP*都是巨噬细胞溶酶体的重要组成部分,在机体免疫方面起到重要作用,其活力水平常被作为评价甲壳类动物健康水平的重要指标^[27]。*ACP*在酸性条件下能破坏表面带有的磷酸酯异物,并通过修饰外源性病原表面的分子结构,增强机体对其识别效应,促进吞噬细胞发挥作用^[28]。*AKP*能够调节机体钙磷平衡,参与机体免疫应答、角蛋白分泌等生物进程^[29]。*LZM*又称胞壁质酶,是一种碱性酶,能够水解细胞壁中的*N*-乙酰胞壁酸和*N*-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4糖苷键,致使细胞壁破裂、细菌溶解^[30-31],常被用作甲壳类动物免疫能力检测指标^[32]。*proPO*系统是甲壳类动物体内重要的免疫系统,其主要存在于血细胞的半颗粒及颗粒细胞中^[33],当机体受到病原侵染时,半颗粒细胞能够识别外源性微生物的多糖分子并与之结合来激活系统,将非活化的酚氧化酶原转变为活化的*PO*,最终形成黑色素参与免疫反应^[34-36]。Hu等^[17]研究发现饲料中添加褐藻寡糖可以显著提高草鱼体内*SOD*、*POD*、*GSH-Px*和谷胱甘肽还原酶(*GR*)等抗氧化酶和*LZM*、*AKP*等免疫酶活性。Ashouri等^[22]研究发现饲料中添加褐藻寡糖可以显著提高尖嘴鲈鱼肝脏中抗氧化水平。Wang等^[37]研究发现饲料中添加褐藻寡糖对刺参中*LZM*、*POD*和*ACP*等免疫相关酶活性具有显著增强效果。Yang等^[16]研究发现饲料中添加褐藻寡糖可以显著提高草鱼的抗氧化水平。杜以帅^[38]研究发现饲料中添加褐藻寡糖可以显著提高刺参体腔液和体壁组织中*LZM*、*ACP*、*AKP*和溶血素的活性。霍圃宇等^[19]的研究发现饲料中添加褐藻寡糖可以增强大菱鲆幼鱼体内*SOD*、*ACP*和*AKP*

活性。江晓路等^[21]研究发现饲料中添加褐藻寡糖可以提高刺参体腔液和体壁中*POD*、*ACP*、*AKP*和*LZM*的活性,但体壁中的增幅要小于体腔液中的增幅。本研究条件下,饲料中添加褐藻寡糖后脊尾白虾体内*SOD*的活性较CK显著增强,说明饲料中添加褐藻寡糖能够增强其体内的抗氧化系统的水平,提高其在外界病原入侵时对ROS清除的能力,减少机体可能受到的损伤。相较于CK,T2处理脊尾白虾肝胰腺中*SOD*活性、肝胰腺和肌肉中*ACP*活性、肝胰腺和肌肉中*AKP*活性、肝胰腺中*PO*活性均极显著提高($P<0.01$)。总的来说,饲料中添加1 000 mg/kg褐藻寡糖对脊尾白虾的抗氧化水平和免疫酶活性提升效果最为显著。

3.3 饲料中添加褐藻寡糖对脊尾白虾免疫基因表达的影响

*SOD*基因编码的蛋白质是抵御ROS诱导损害的第一道防线,同时也是抗氧化防御系统的重要组成部分^[39]。在环境胁迫等条件下,*SOD*将 O_2^- 转化为分子氧或歧化 H_2O_2 以清除应激诱导的过量ROS,从而保护组织和细胞免受氧化损伤^[40]。*proPO*系统是甲壳动物体液免疫的重要组成部分,主要参与抵御病原体的免疫过程^[41]。*LZM*是一种重要的非特异性免疫因子,通过杀死细菌以防止细菌感染^[42],还能诱导和调节其他免疫因子的合成和分泌^[43-44]。*LGBP*是一种重要的模式识别受体,通过激活先天免疫防御在无脊椎动物中发挥重要作用^[45]。*LGBP*具有促进血淋巴细胞的吞噬、黑化、包裹、凝集等作用,还可以激活*proPO*级联反应,清除入侵微生物^[46]。*SR*由骨髓细胞(巨噬细胞和树突状细胞)和某些内皮细胞表达,是一种大型的膜结合受体超家族,配体广泛^[47],且能与细菌和凋亡细胞结合并内吞^[48]。Qin等^[49]利用转录组技术发现凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)被副溶血弧菌感染后,血淋巴中*SR*的转录水平显著上升,敲除该基因后发现虾体抗菌能力显著降低,表明*SR*在先天免疫中起重要作用。*CTSB*是一种蛋白质水解酶,以酶原形式存在于溶酶体中,具有水解多种蛋白质的功能^[50],能够促进细胞凋亡的发生^[51-52]。*CTL*是 Ca^{2+} 依赖性碳水化合物识别蛋白的一大家族^[53],是甲壳类动物中一种具有识别病原体特殊糖识别结构域的模式受体^[54-55],具有细胞黏附、细菌清除、吞噬和*proPO*激活等功能^[56-57]。Thaimuangphol等^[58]对

感染嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的仙虾 (*Streptocephalus sirindhornae*) 进行转录组测序发现, 感染组的 *CTL* 表达量是对照组的 3 倍, 说明其在机体的先天免疫中扮演重要角色。Hu 等^[17] 发现饲料中添加褐藻寡糖可以显著提高草鱼体内白介素-10、白介素-1 β 、白介素-8 和肿瘤坏死因子- α 的基因表达水平。Ashouri 等^[22] 发现饲料中添加褐藻寡糖可以提高尖嘴鲈鱼体内 c 和 g 型溶菌酶基因的表达水平。本研究中 T1 处理 *LGBP* 基因在脊尾白虾肝胰腺中相对表达量极显著高于 CK ($P < 0.01$), T2 处理 *SOD*、*LGBP* 基因在脊尾白虾肝胰腺中相对表达量均极显著高于 CK ($P < 0.01$), 各处理 *LZM*、*SR* 和 *CTSB* 基因在脊尾白虾肝胰腺中相对表达量与 CK 均无显著差异 ($P > 0.05$)。虽然 *CTSB* 基因和 *CTL* 基因在脊尾白虾肌肉中可以被检测出, 但相对表达量与 CK 均无显著差异 ($P > 0.05$)。总的来说, 饲料中添加 1 000 mg/kg 褐藻寡糖可以提高脊尾白虾体内部分抗氧化和免疫相关基因的表达量, 提高脊尾白虾的抗氧化水平和免疫能力, 这一结果与上述酶活性结果一致。

3.4 饲料中添加褐藻寡糖对脊尾白虾抗二尖梅奇酵母 MQ2101 能力的影响

Hu 等^[17] 发现饲料中添加褐藻寡糖增强了草鱼的免疫能力, 并提高了草鱼对嗜水气单胞菌的抗性。本研究中, 二尖梅奇酵母 MQ2101 攻毒感染后, 饲料中添加褐藻寡糖的脊尾白虾存活率在第 3~5 d 均极显著高于 CK ($P < 0.01$), 且各组达到半数死亡率的时间也迟于 CK, 说明饲料中添加褐藻寡糖对脊尾白虾抵抗二尖梅奇酵母 MQ2101 的能力具有一定的提高作用, 这与上述其对脊尾白虾抗氧化和免疫能力的增强作用一致。感染 6~7 d 时, 饲料中添加褐藻寡糖的脊尾白虾存活率和 CK 几乎一致, 均接近 10%, 说明随着病原菌在脊尾白虾体内的大量增殖, 突破其免疫调节能力范畴后, 饲料中添加褐藻寡糖也无法使脊尾白虾长期存活。

综上所述, 饲料中添加 1 000 mg/kg 褐藻寡糖对脊尾白虾的生长性能和免疫能力具有提高效果, 且无毒副作用, 对二尖梅奇酵母 MQ2101 具有一定的防控作用。

参考文献:

- [1] 马鸿梅, 王兴强, 曹梅, 等. 脊尾白虾养殖研究进展[J]. 现代农业科技, 2019, (16): 171-175.
- [2] 沈晔, 王兴强, 曹梅, 等. 脊尾白虾养殖技术研究[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(15): 76-80.
- [3] 赵然, 史文军, 王李宝, 等. 脊尾白虾“僵尸病”的初探[J]. 水产学报, 2023, 47(9): 165-174.
- [4] SÖDERHÄLL K, CERENIUS L. Crustacean immunity[J]. Annual Review of Fish Diseases, 1992, 2: 3-23.
- [5] SÖDERHÄLL I. Crustacean hematopoiesis[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 58: 129-141.
- [6] IWANAGA S, LEE B L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals[J]. BMB Reports, 2005, 38(2): 128-150.
- [7] LITTLE T J, HULTMARK D, READ A F. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology[J]. Nature Immunology, 2005, 6(7): 651-654.
- [8] SÖDERHÄLL K, HERGENHAHN H G, JOHANSSON M W, et al. The regulation of the prophenoloxidase activating system in crustaceans[J]. Developmental & Comparative Immunology, 1986, 10(4): 622-622.
- [9] LIU J, YANG S, LI X, et al. Alginate oligosaccharides: production, biological activities, and potential applications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(6): 1859-1881.
- [10] KHALIL H P S, LAI T K, TYE Y Y, et al. A review of extractions of seaweed hydrocolloids: properties and applications[J]. Express Polymer Letters, 2018, 12(4): 296-317.
- [11] 乔明. 褐藻胶裂解酶产生菌的筛选, 基因克隆表达及酶法制备的褐藻寡糖对提高植物逆境抗性的作用[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [12] 孙哲朴, 刘辉, 武欣雨, 等. 褐藻胶寡糖制备和生物活性的研究进展[J]. 食品工业, 2019, 40(2): 284-289.
- [13] FALKEBORG M, CHEONG L Z, GIANFICO C, et al. Alginate oligosaccharides: enzymatic preparation and antioxidant property evaluation[J]. Food Chemistry, 2014, 164: 185-194.
- [14] 李玉芬. 褐藻胶寡糖的酶解制备及其应用研究[D]. 福州: 福州大学, 2018.
- [15] LI F, TANG Y, WEI L, et al. Alginate oligosaccharide modulates immune response, fat metabolism, and the gut bacterial community in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 130: 103-113.
- [16] YANG M, LU Z, LI F, et al. Alginate oligosaccharide improves fat metabolism and antioxidant capacity in the liver of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Aquaculture, 2021, 540: 736664.
- [17] HU J, ZHANG J, WU S. The growth performance and non-specific immunity of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) affected by dietary alginate oligosaccharide[J]. 3 Biotech, 2021, 11(2): 46.
- [18] 霍圃宇. 壳寡糖、褐藻酸寡糖对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 生长、免疫指标、血液指标影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
- [19] 霍圃宇, 潘金露, 韩雨哲, 等. 褐藻酸寡糖对大菱鲆幼鱼生长性

- 能,血液学指标及非特异性免疫影响[J]. 广东海洋大学学报, 2015,35(4):10-16.
- [20] 王 鹏,江晓路,江艳华,等. 褐藻低聚糖对提高大菱鲆免疫机能的作用[J]. 海洋科学,2006,30(8):6-9.
- [21] 江晓路,杜以帅,王 鹏,等. 褐藻寡糖对刺参体腔液和体壁免疫相关酶活性变化的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2009,39(6):1188-1192.
- [22] ASHOURI G, SOOFIANI N M, HOSEINIFAR S H, et al. Influence of dietary sodium alginate and *Pediococcus acidilactici* on liver antioxidant status, intestinal lysozyme gene expression, histomorphology, microbiota, and digestive enzymes activity, in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles [J]. Aquaculture, 2020, 518: 734638.
- [23] 潘金露,韩雨哲,霍圃宇,等. 饲料中添加褐藻寡糖对大菱鲆肠道结构,消化酶活性及表观消化率的影响[J]. 广东海洋大学学报,2016,36(3):39-44.
- [24] 王 刚. 凡纳滨对虾免疫基因克隆与合并感染条件下的免疫应答[D]. 湛江:广东海洋大学,2015.
- [25] IGHODARO O M, AKINLOYE O A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX); their fundamental role in the entire antioxidant defence grid [J]. Alexandria Journal of Medicine, 2018, 54(4):287-293.
- [26] GILGUN-SHERKI Y, ROSENBAUM Z, MELAMED E, et al. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state[J]. Pharmacological Reviews, 2002, 54(2):271-284.
- [27] 王庚申,谢建军,施 慧,等. 不同盐度对脊尾白虾非特异性免疫及抗氧化酶活性的影响[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版),2013,32(6):499-502.
- [28] YANG C, KONG J, WANG Q, et al. Heterosis of haemolymph analytes of two geographic populations in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(1):62-70.
- [29] 张 明,王 雷,郭振宇,等. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响[J]. 海洋科学, 2004,28(7):22-25.
- [30] 李 雯,陶 妍. 鲤鱼 g 型溶菌酶基因的 cDNA 克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2017,46(1):81-88.
- [31] 李雪雪,阮灵伟. 超深渊钩虾 *Eurythenes gryllus* i 型溶菌酶的基因克隆与表达[J]. 应用海洋学学报,2020,39(1):42-48.
- [32] 林亲录,马美湖,金阳海,等. 鸡蛋卵清中溶菌酶的提取与纯化[J]. 食品科学,2002,23(2):43-46.
- [33] 岳 峰,潘鲁青,谢 鹏,等. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹酚氧化酶原系统和免疫指标的影响[J]. 中国水产科学,2010,17(4):761-770.
- [34] CERENIUS L, SÖDERHÄLL K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates [J]. Immunological Reviews, 2004, 198(1):116-126.
- [35] CERENIUS L, LEE B L, SÖDERHÄLL K. The proPO-system; pros and cons for its role in invertebrate immunity [J]. Trends in Immunology, 2008, 29(6):263-271.
- [36] 郭 慧,冼健安,毕建柱,等. 虾类免疫因子的研究进展[J]. 饲料工业,2013,34(22):42-46.
- [37] WANG X, WANG L, CHE J, et al. *In vitro* non-specific immunostimulatory effect of alginate oligosaccharides with different molecular weights and compositions on sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) coelomocytes [J]. Aquaculture, 2014, 434:434-441.
- [38] 杜以帅. 酶解海藻产物对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 肠道菌群和免疫相关因子的影响[D]. 青岛:中国海洋大学,2010.
- [39] ALEEM M, ALEEM S, SHARIF I, et al. Characterization of SOD and GPX gene families in the soybeans in response to drought and salinity stresses [J]. Antioxidants, 2022, 11(3):460.
- [40] DAS K, ROYCHOUDHURY A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants [J]. Frontiers in Environmental Science, 2014, 2:53.
- [41] KIM M S, MIN E Y, KIM J H, et al. Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* reared in bio-floc culture system using probiotics [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 47(1):141-146.
- [42] KONG X, WANG S, JIANG H, et al. Responses of acid/alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus* [J]. Aquatic Toxicology, 2012, 120:119-125.
- [43] BOMAN H G, FAYE I, GUDMUNDSSON G H, et al. Cell-free immunity in *Cecropia*: a model system for antibacterial proteins [J]. EJB Reviews, 1991, 1992:189-197.
- [44] MORI K, NAKANISHI T, SUZUKI T, et al. Defense mechanisms in invertebrates and fish [J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso Protein Nucleic Acid Enzyme, 1989, 34(3):214-223.
- [45] ZHANG D, MA J, JIANG J, et al. Molecular characterization and expression analysis of lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan-binding protein (LGBP) from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37:3335-3343.
- [46] YU X Q, ZHU Y F, MA C, et al. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(10):1287-1293.
- [47] FAN S, WANG F, XIE Z, et al. Molecular characterization and functional analysis of scavenger receptor class B from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2021, 51:40-49.
- [48] CANTON J, NECULAI D, GRINSTEIN S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity [J]. Nature Reviews Immunology, 2013, 13(9):621-634.
- [49] QIN Z, BABU V S, WAN Q, et al. Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged by *Vibrio parahaemolyticus* reveals unique immune-related genes [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 77:164-174.

- [50] AGGARWAL N, SLOANE B F. Cathepsin B; multiple roles in cancer[J]. PROTEOMICS-Clinical Applications, 2014, 8(5/6): 427-437.
- [51] WANG Y, ZHANG S, LIU Z, et al. Characterization and expression of *AmphiCL* encoding cathepsin L proteinase from amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* [J]. Marine Biotechnology, 2005, 7: 279-286.
- [52] YI P, HU X, HU B, et al. Identification and expression of cathepsin B from the freshwater mussel *Cristaria plicata* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 225: 21-28.
- [53] ZELENSKY A N, GREASY J E. The C-type lectin-like domain superfamily [J]. The FEBS Journal, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [54] ALEX N Z, JILL E G. The C-type lectin-like domain superfamily [J]. FEBS Journal, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [55] BI J, NING M, XIE X, et al. A typical C-type lectin, perlucin-like protein, is involved in the innate immune defense of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 103: 293-301.
- [56] LI M, LI C, MA C, et al. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 46(2): 231-240.
- [57] WONGPANYA R, SENGPRASERT P, AMPARYUP P, et al. A novel C-type lectin in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* functions as a pattern recognition receptor by binding and causing bacterial agglutination [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 60: 103-113.
- [58] THAIMUANGPHOL W, SANOAMUANG L, WANGKAHART E. The immune response of fairy shrimp *Streptocephalus sirindhornae* against bacterial black disease by de novo transcriptome analysis [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 121: 108-115.

(责任编辑: 成纾寒)