



# 读书报告

朱振祥

2017.4.28



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Aquaculture

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aqua-online](http://www.elsevier.com/locate/aqua-online)

Effects of dietary supplementation of intestinal autochthonous bacteria on the innate immunity and disease resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

Zhuo-Qi Wu, Chao Jiang, Fei Ling, Gao-Xue Wang\*

College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

IF : 1.893

# 目录/Contents



**01**

实验背景

**02**

材料和方法

**03**

结论

**04**

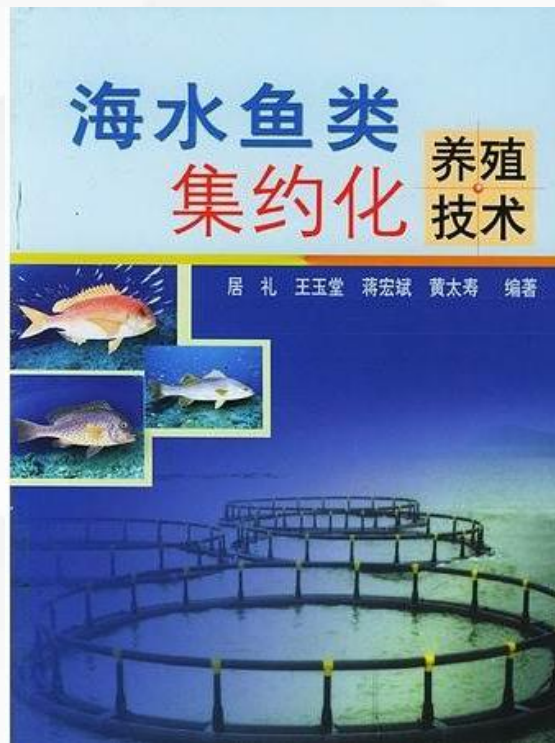
讨论

01



# 实验背景

## 1. 集约化农业的快速发展



## 2. 细菌性疾病出现导致较高的经济损失



∞ 抗生素成为首选治疗策略

中国饲料行业信息网  
www.chinafeed.com.cn

### 水产养殖的病原抗生素耐药性（举例）

抗生素类属	人类药物的重要性	抗生素举例	耐药性病原菌	病原菌来源
氨基糖苷类	极其重要	链霉素	气单胞菌属	越南，菲律宾
氨基糖苷类	重要	庆大霉素	杆菌属，假单胞菌属	智利，淡水鲑鱼场
β-内酰胺类	极其重要	阿莫西林	变形链球菌，链球菌，气单胞菌属	意大利，各类养殖设施
β-内酰胺类	重要	氨基青霉素	哈维氏弧菌	印尼，虾类养殖场，沿海水域
四环素类	极为重要	四环素	副溶血弧菌	西班牙，葡萄牙，大曼群，西非
大环内酯类	极其重要	红霉素	沙门氏菌	中国大陆，市场在黄鱼类
氨基糖苷类	极其重要	庆大霉素	嗜水气单胞菌	希腊，南非，刚
氨基糖苷类	重要	庆大霉素	嗜水气单胞菌	中国台湾，各种对虾
氨基糖苷类	极为重要	庆大霉素	气单胞菌属，假单胞菌属，弧菌	菲律宾，各种对虾
磺胺类	重要	磺胺嘧啶	气单胞菌	印度，喀拉蚩，印度鲑
四环素类	非常重要	四环素	嗜水气单胞菌	埃及，扇形鱼和罗非鱼
四环素类	重要	四环素	嗜水气单胞菌	加拿大，大西洋鲑

#### 4. 抗生素的长期使用会导致药物残留和耐药性等负面影响





5. 益生菌大量的被研究来取代抗生素。



实物拍摄



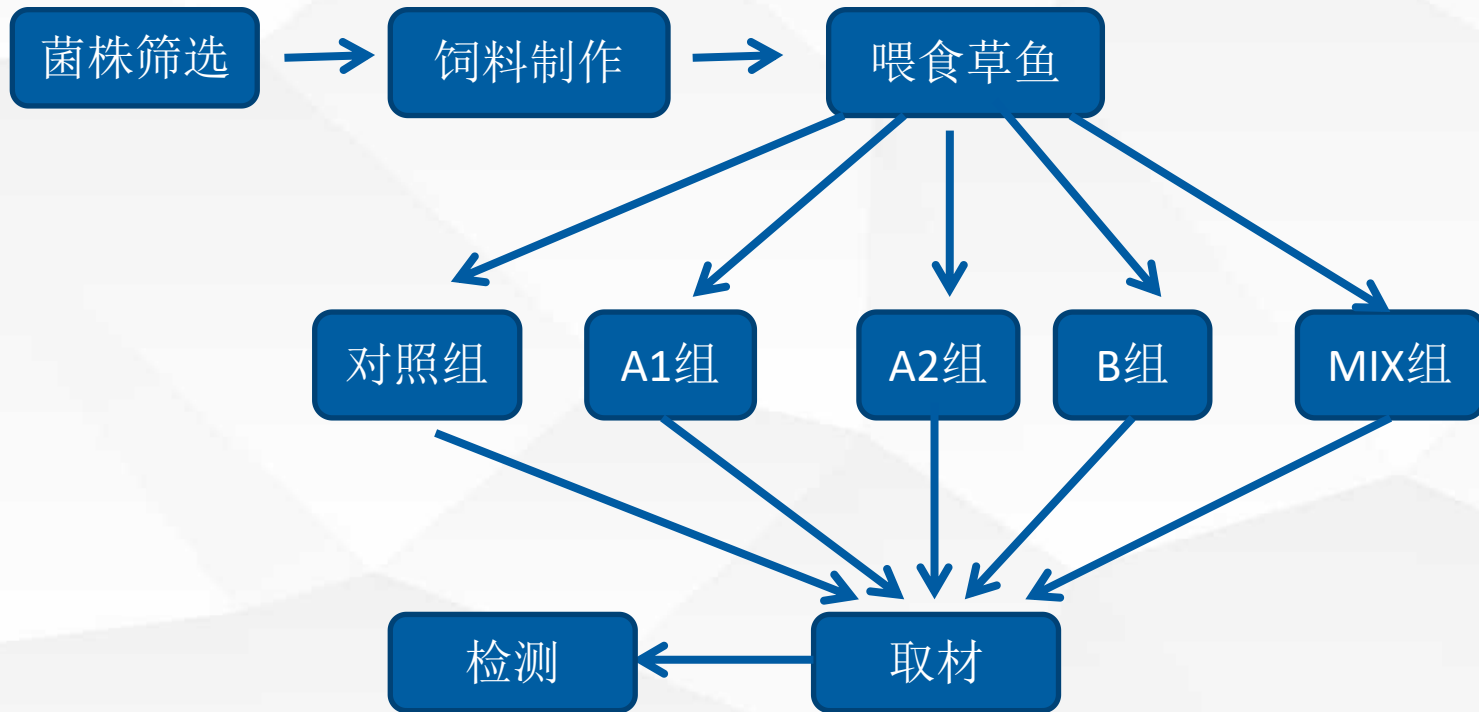
6. 肠道内土著菌株成为益生菌的筛选的候选者。
7. 本实验选择草鱼肠道内三株菌株 (*Shewanella xiamenensis* A-1, *S.xiamenensis* A-2, *Aeromonas veronii* A-7) 进行研究单个或组合使用, 其对草鱼的先天免疫以及抗病能力的影响。



# 02



## 材料和方法



## 饲料配方

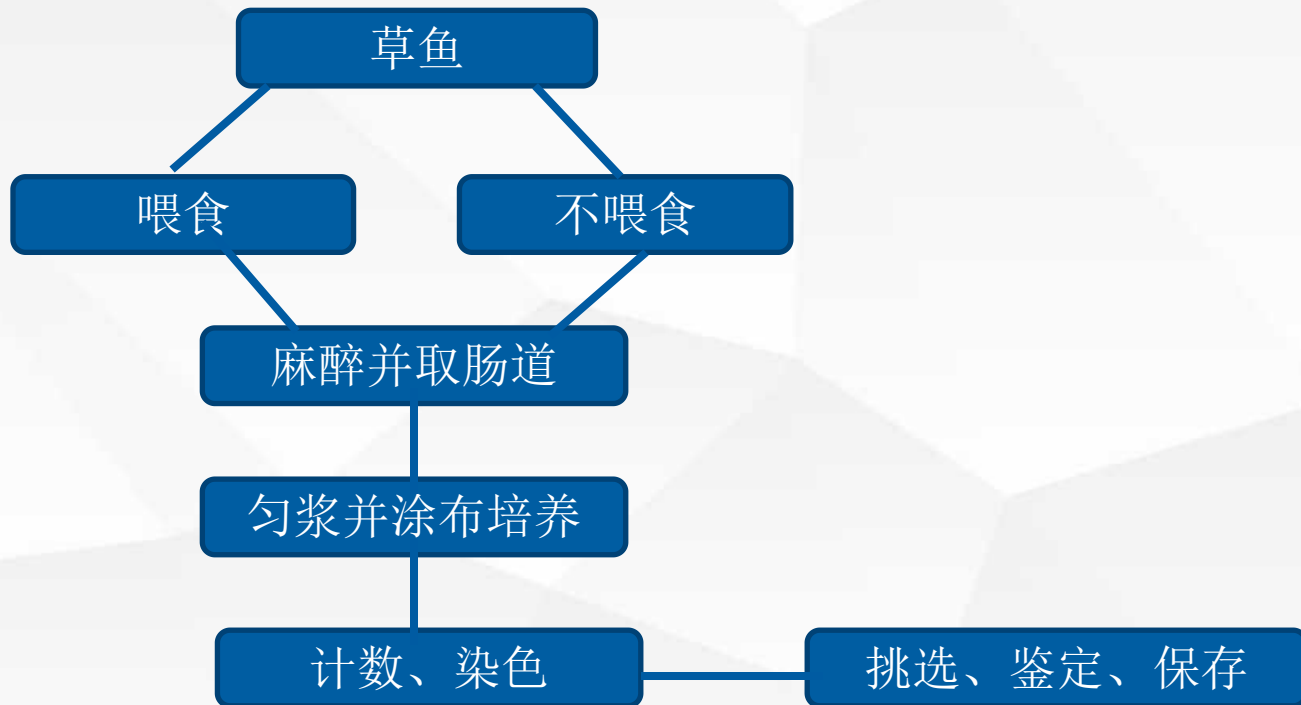
1. 实验材料：草鱼 35g ± 5g
2. 实验环境：水温 25℃左右，每天亮灯16小时，每天按体重2%投喂，每天喂食两次，每天换30%的水。

**Table 1**

Ingredient and chemical proximate composition of basic diet (% as feed).

Ingredient	%
Soybean meal <sup>a</sup>	36
Fish meal <sup>b</sup>	25
Wheat meal	20
Corn meal	15
Soybean oil	2
α-Starch	1
Mineral and vitamin mixture <sup>c</sup>	1
<i>Proximate analysis</i>	
Crude protein	25.9
Crude lipid	4.6
Crude fiber	5.8
Ash	10.7

## 菌种的选择流程图



**菌种的选择：**分两组鱼，每组10条，其中一组按体重2%喂食，另一组不喂食。喂食28天实验结束后使用MS-222进行麻醉，处死草鱼并取出肠道，用灭菌的0.85%鱼用生理盐水冲洗去除肠内容物。称取0.5g肠道在5mL中无菌0.85%鱼用生理盐水中匀浆。设置9个稀释梯度并取出100微升涂布于琼脂培养基（NAP）中。25°C，培养48h，对细菌菌落进行计数和表征观察，革兰氏染色。随机三十个挑选不同表型的菌落，通过16S rDNA基因测序鉴定。最后，选择三株溶血和注射测定并保存在-70°C。

## 饲料制作流程图





**饲料的制作：** 取三株菌株接种在NB培养基中，28℃培养2天。之后4℃，3000g，离心10分钟进行收集，用无菌的0.85% NaCl溶液洗涤两次并调节细菌浓度在 $10^8$  cell/ml。

饲料制作分为5组，将活细菌悬浮液的量慢慢喷入饲料中，在鼓式搅拌机中部分地混合。饲料使用冷冻干燥至水分10%左右，然后粉碎并储存在-20℃。

菌株的生存能力采用计数NAP上接种的菌落数的方法来保证。

**血清样品免疫指标测定：** 在第7天，14天，21天和28天每养殖单元随机取3条鱼，收集血液样本，并混合三条鱼的血液以减少个体间变异。每个养殖单元的血液分为三份：

- 1) 取1 ml血液样品立即用于白细胞分离，并调节至 $1 \times 10^7$  cell/ml。
- 2) 取1ml血液样品4°C，3000g离心10分钟收集血清，保存在-20°C。
- 3) 取100  $\mu$  l其余的血液样品用于RNA提取。

## 呼吸爆发活力测定：

- 1.将硝基蓝四唑（NBT）和PMA，溶解在二甲基亚砷（DMSO）中。
- 2.依次加入100  $\mu$ l稀释的白细胞，100  $\mu$ l PMA和将100  $\mu$ l NBT到无菌EP管中。
- 3.25°C下温育30min后540g 离心10min。
- 4.轻轻取出上清液，将细胞用1ml 70%甲醇固定3分钟后用70%甲醇洗涤两次。
- 5.将formazan blue crystals溶于140  $\mu$ l DMSO和120  $\mu$ l 2M KOH中。
- 6.以KOH / DMSO为空白对照，通过分光光度计在630nm下测量所得溶液的OD值。

## 吞噬活性测定：

- 1.取  $1 \times 10^7$  cell/ml-1 白细胞悬浮液  $100 \mu$  l 置于  $25^\circ\text{C}$  的无菌玻璃载玻片上 30min， 然后加入  $1 \times 10^8$  cell/ml-1 酵母悬浮液  $100 \mu$  l 到细胞单层。
- 2.将载玻片在  $25^\circ\text{C}$  下孵育 45 分钟， 然后用 PBS (pH 6.2) 洗涤三次。
- 3.玻璃片用乙醇固定， 干燥并用吉姆萨染色。
- 4.在显微镜下计数 200 个吞噬细胞， 计算吞噬细胞的百分比。

溶菌酶活性测定：在530nm处导致 $0.001\text{min}^{-1}$ 的吸光度降低的血清溶菌酶的量。

总血清蛋白、白蛋白、球蛋白含量的测定：自动生化分析仪分析。

补体C3测定：使用南京建成血清补体C3测定试剂盒测定。

攻毒试验：养殖实验结束后取出每养殖单元取出10条鱼，分别注射嗜水气单胞菌，攻毒14天并不喂食。每天观察草鱼死亡数，并计算相对保护率（RPS）。

$$\text{RPS} = \left( 1 - \frac{\text{Percent mortality in treated group}}{\text{Percent mortality in control group}} \right) \times 100$$

## 实时定量PCR分析基因的表达

**Table 2**

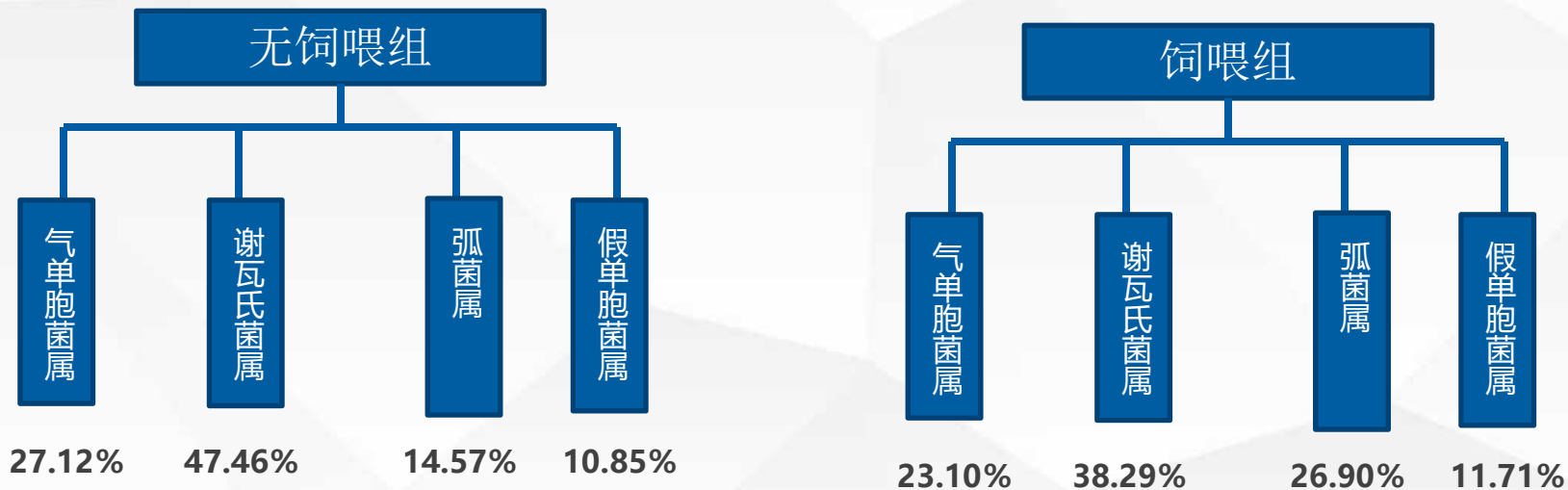
Sequences of primers and the conditions used for real-time PCR.

Cytokine genes	Accession no.	Primer sequence(5'-3'), forward (F) and reverse (R)	Product size (bp)
$\beta$ -Actin	M25013	F: GATGATGAAATTGCCGCACTG R: ACCGACCATGACGCCCTGATGT	135
IL-8	EU047717	F: ATCCACGCTGTCCG R: TCTTTACAGTGAGGGCTA	94
IL-1 $\beta$	EU047716	F: GGAGAATGTGATCGAAGAGCGT R: GCTGATAAACCATCCGGGA	448
TNF- $\alpha$	EU047718	F: ACGCTCAACAAGTCTCAG R: CTGGCTGTAGACGAAGTAA	252
Lysozyme-C	EU835654	F: TGGATGTCCTTGTGCGAGAG R: CCTCAAAGCCATCAAGTCCC	85

# 03



## 结 论



结果表明，鲤鱼的本土肠道细菌主要由气单胞菌属，谢瓦氏菌属，弧菌属和假单胞菌属组成。



## 体液免疫反应

**Table 3**

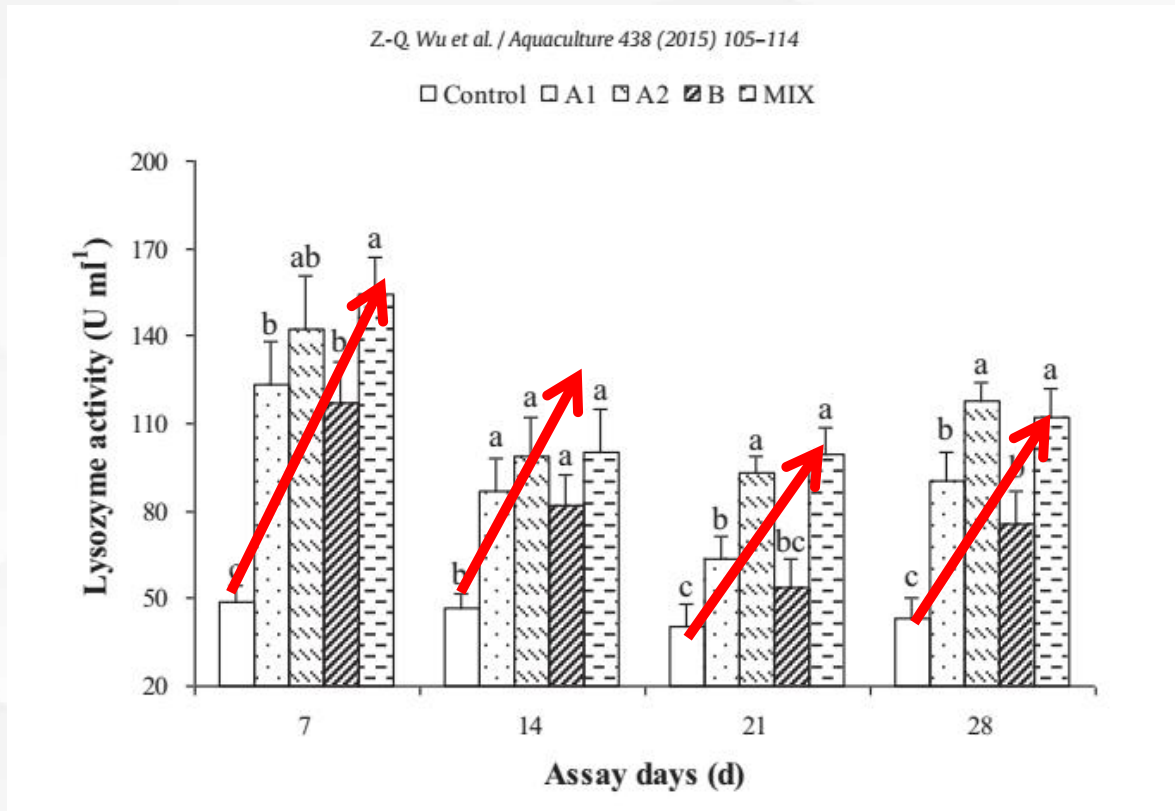
Total serum protein, albumin and globulin levels observed on different assay days after feeding supplement diets in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. Data are expressed as mean  $\pm$  SD at the same sampling time with different letters as significantly different ( $P < 0.05$ ), three replicates were set.

Parameters	Groups	7 days	14 days	21 days	28 days	
Total protein ( $\text{g l}^{-1}$ )	Control	28.83 <sup>a</sup> $\pm$ 2.42	28.87 <sup>a</sup> $\pm$ 1.58	28.63 <sup>a</sup> $\pm$ 1.84	27.83 <sup>a</sup> $\pm$ 2.05	
	A1	29.27 <sup>a</sup> $\pm$ 1.57	31.40 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.05	30.97 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.14	29.40 <sup>a</sup> $\pm$ 3.40	
	A2	31.70 <sup>a</sup> $\pm$ 4.05	33.43 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.85	32.70 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.00	30.20 <sup>a</sup> $\pm$ 3.30	
	B	28.73 <sup>a</sup> $\pm$ 2.48	32.33 <sup>bc</sup> $\pm$ 2.08	30.90 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.78	30.07 <sup>a</sup> $\pm$ 3.61	
	MIX	34.37 <sup>a</sup> $\pm$ 3.36	34.13 <sup>c</sup> $\pm$ 1.03	33.50 <sup>b</sup> $\pm$ 3.30	31.57 <sup>a</sup> $\pm$ 2.77	
	Albumin ( $\text{g l}^{-1}$ )	Control	14.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.23	14.67 <sup>a</sup> $\pm$ 1.17	14.30 <sup>a</sup> $\pm$ 1.25	14.17 <sup>a</sup> $\pm$ 0.42
Albumin ( $\text{g l}^{-1}$ )	A1	14.27 <sup>a</sup> $\pm$ 0.67	18.30 <sup>b</sup> $\pm$ 0.70	15.73 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.57	13.77 <sup>a</sup> $\pm$ 0.36	
	A2	16.17 <sup>a</sup> $\pm$ 0.71	19.23 <sup>b</sup> $\pm$ 0.57	16.07 <sup>b</sup> $\pm$ 0.35	14.60 <sup>a</sup> $\pm$ 1.29	
	B	14.70 <sup>a</sup> $\pm$ 1.81	15.17 <sup>a</sup> $\pm$ 0.80	14.33 <sup>a</sup> $\pm$ 0.55	13.60 <sup>a</sup> $\pm$ 0.20	
	MIX	15.63 <sup>a</sup> $\pm$ 2.25	19.47 <sup>b</sup> $\pm$ 0.25	16.20 <sup>b</sup> $\pm$ 1.31	15.37 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.91	
	Globulin ( $\text{g l}^{-1}$ )	Control	15.20 <sup>a</sup> $\pm$ 0.66	14.60 <sup>a</sup> $\pm$ 1.81	14.67 <sup>a</sup> $\pm$ 2.04	14.53 <sup>a</sup> $\pm$ 1.59
		A1	18.10 <sup>b</sup> $\pm$ 0.44	16.70 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.81	15.50 <sup>a</sup> $\pm$ 1.76	17.67 <sup>a</sup> $\pm$ 3.95
A2		19.20 <sup>b</sup> $\pm$ 0.62	18.53 <sup>b</sup> $\pm$ 2.46	17.70 <sup>a</sup> $\pm$ 4.41	18.33 <sup>a</sup> $\pm$ 2.95	
B		18.17 <sup>b</sup> $\pm$ 2.35	16.20 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.15	15.13 <sup>a</sup> $\pm$ 2.61	17.23 <sup>a</sup> $\pm$ 3.18	
MIX		19.67 <sup>b</sup> $\pm$ 0.78	19.87 <sup>b</sup> $\pm$ 1.25	18.70 <sup>a</sup> $\pm$ 2.90	18.87 <sup>a</sup> $\pm$ 2.64	

A1, A2, B, MIX组血清蛋白, 白蛋白, 球蛋白含量均显着升高

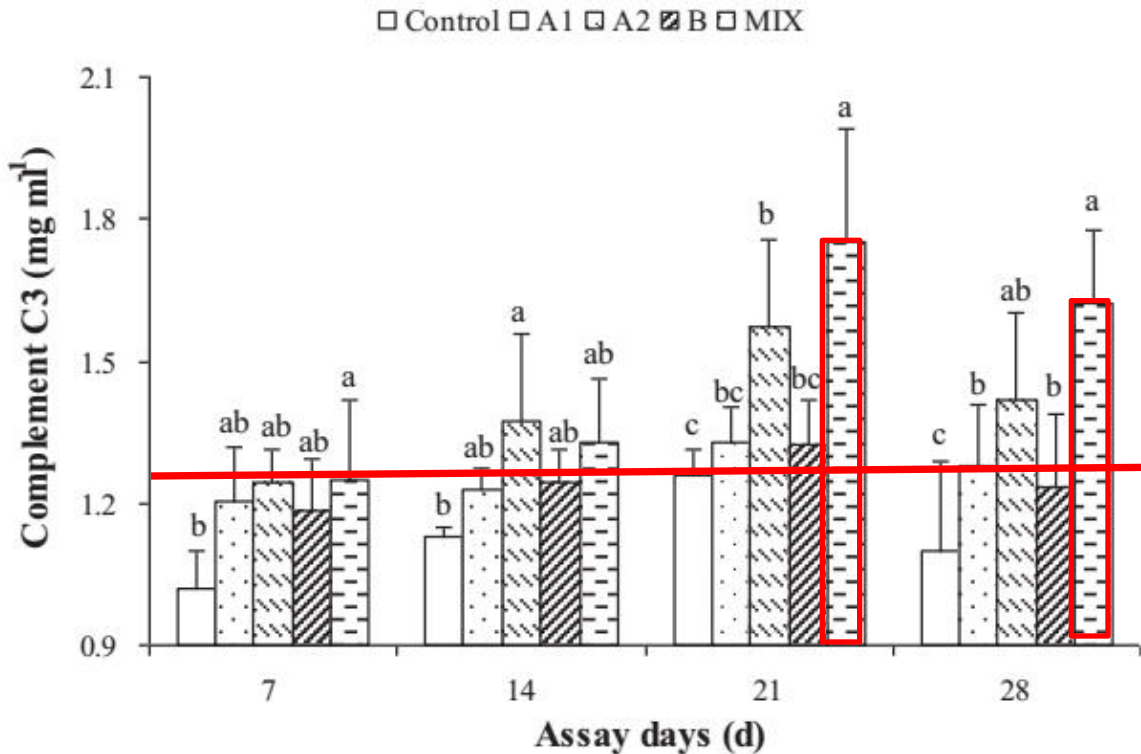
## 体液免疫反应

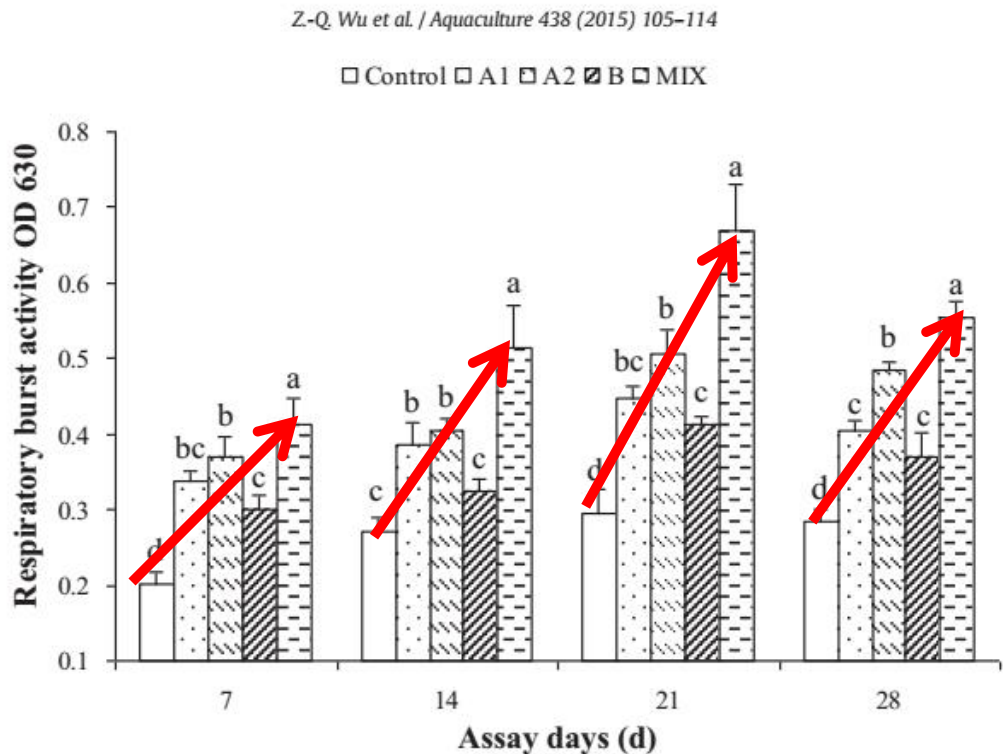
在整个试验中，与对照组相比，A1，A2，B和MIX组中的血清溶菌酶活性观察到显著增加（ $P < 0.05$ ）。



## 体液免疫反应

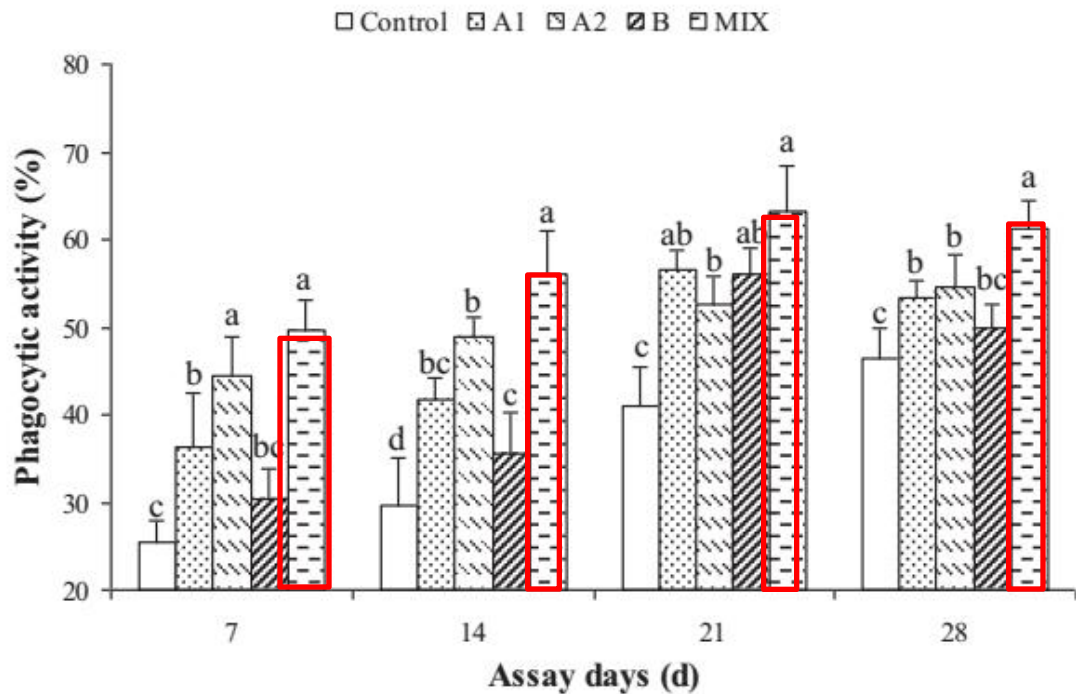
在实验中，A1，A2，B，和MIX中补体C3水平明显高于对照组（ $P < 0.05$ ）。而且，MIX组在第21天和第28天具有比其他组更高的活性。





## 细胞免疫反应

在整个试验中，A1，A2，B和MIX的呼吸爆发活力均显著增加（ $P < 0.05$ ）。但是B组与其他实验组相比较低。

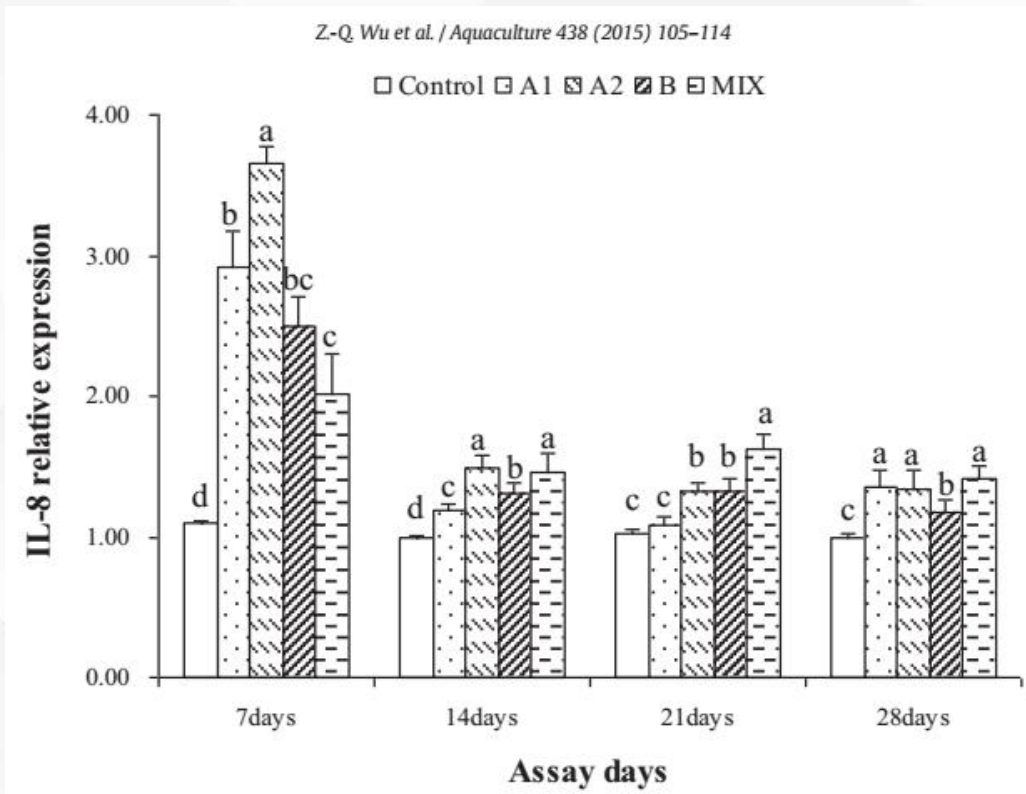


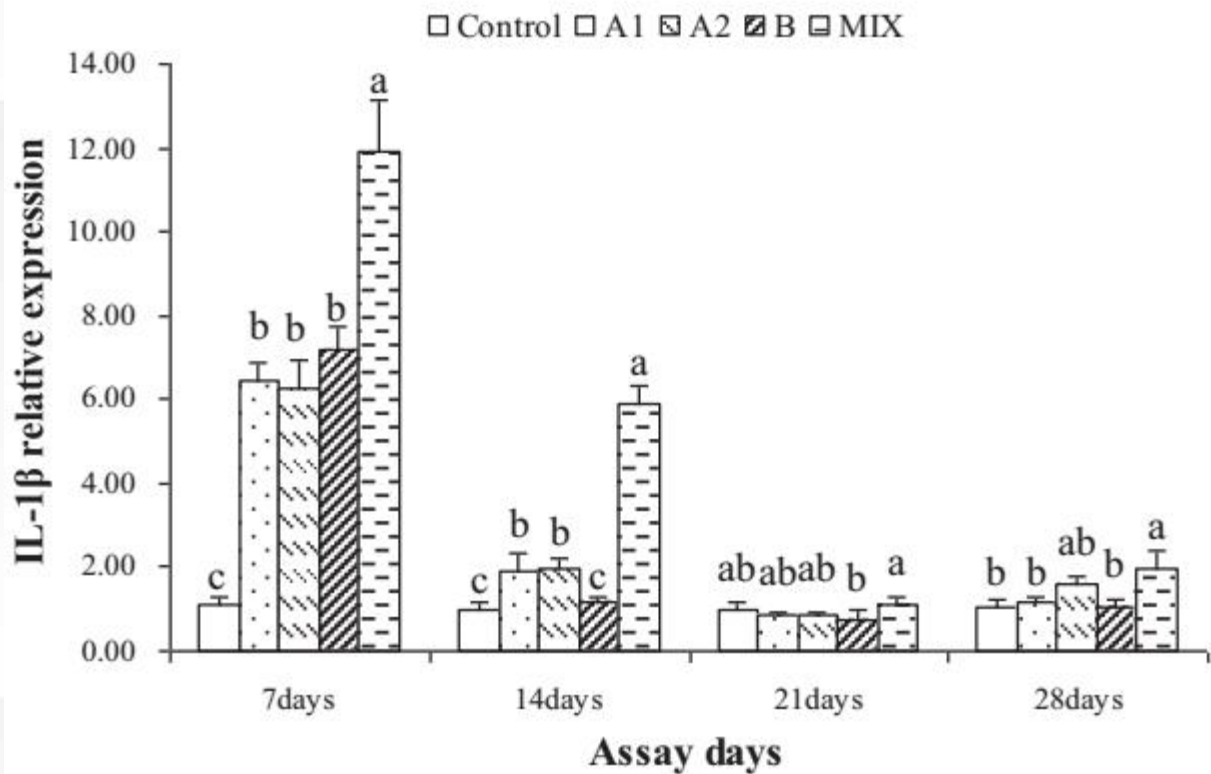
## 细胞免疫反应

喂食7天后，所有实验组中吞噬活性显著增加 ( $P < 0.05$ )。且与其他实验组相比，MIX组吞噬能力明显提高。

## 免疫基因表达量

整个试验中，与对照组相比，在A1，A2，B和MIX组中观察到IL-8的表达量显著增加（ $P < 0.05$ ）。



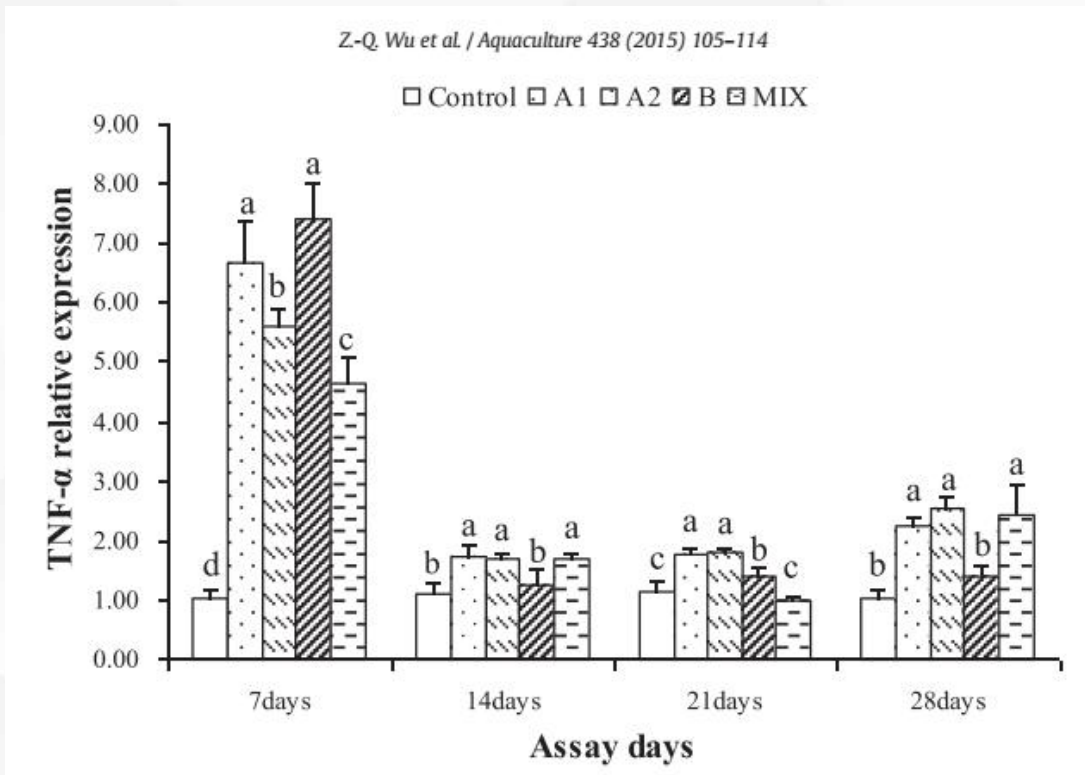


## 免疫基因表达量

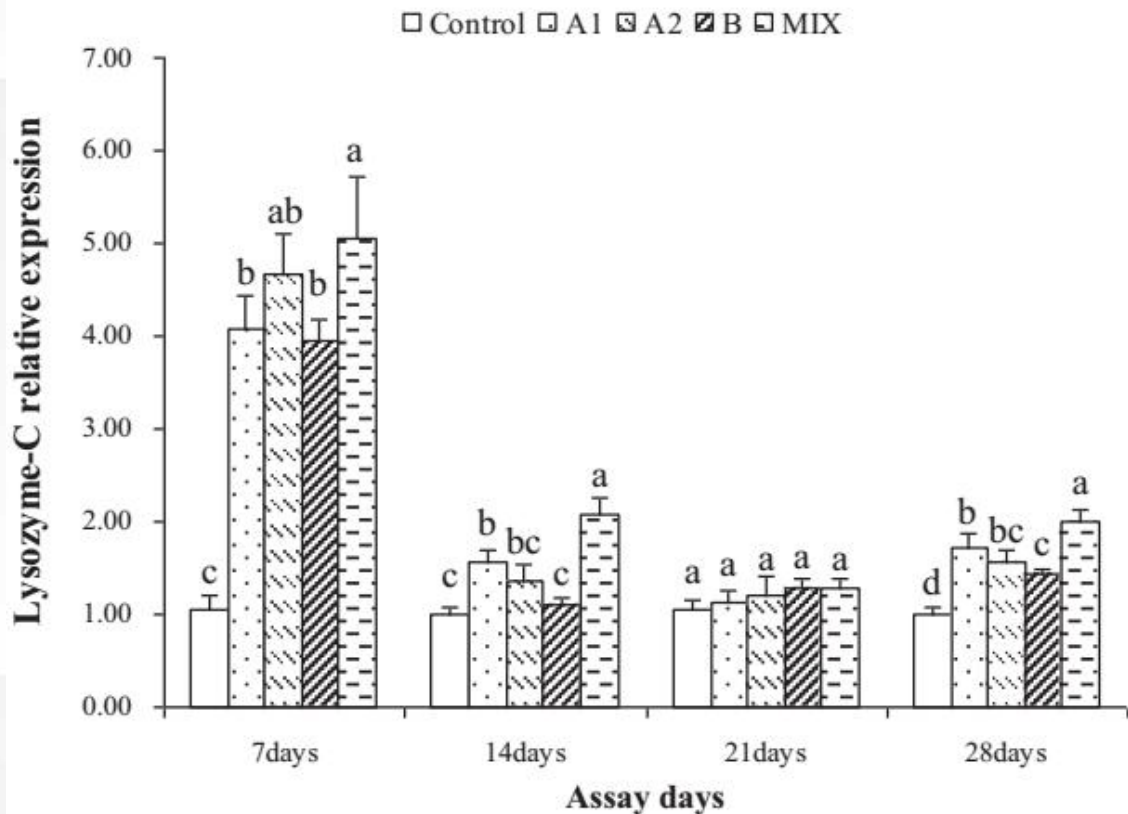
实验中，在第7天，第14天，在A1，A2和MIX组中，IL-1 $\beta$ 的表达观察到上调。

## 免疫基因表达量

实验中，在第7，14和28天，A1，A2和MIX的TNF- $\alpha$ 的表达明显高于对照组。







## 免疫基因表达量

实验中，在第7，14或28天，A1，A2，B和MIX组中，溶菌酶C的表达显著上调。

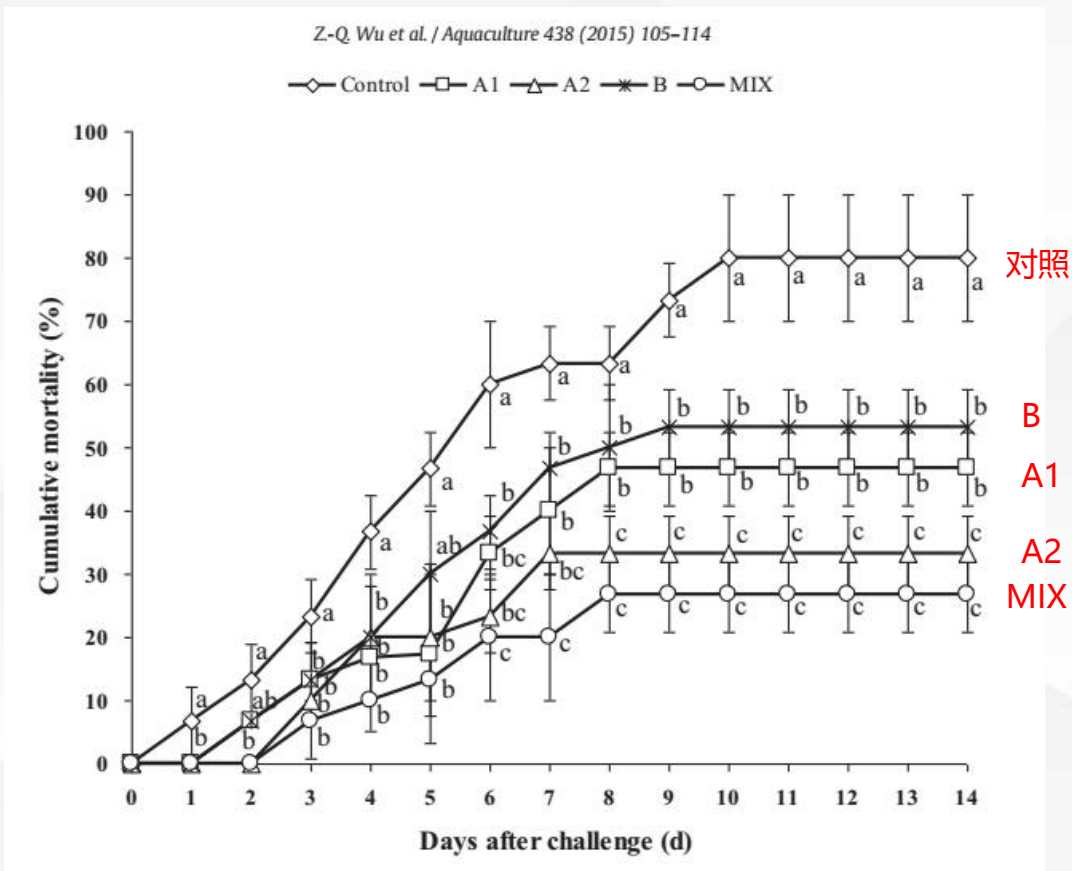
## 疾病的抵抗能力

累积死亡率:

A1 = 46.67%, A2 = 33.33%

B = 53.33%, MIX = 26.67%

对照组=80%，在感染后第14天，MIX、A1和B组的累积死亡率和RPS与对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。



# 04



## 讨论

1.整个试验中，A1，A2，B和MIX组中鱼的非特异性免疫力增强，特别是A1，A2和MIX组与对照组相比，呼吸爆发显著增加。

2.血清补体C3的水平在A1，A2，B和MIX组中短期增加可能会受益于鱼的健康影响。

3.溶菌酶C在成熟的巨嗜细胞中含量很高并随巨噬细胞的发育，溶菌酶的含量不断提高，说明溶菌酶活力越高免疫越强。

4.血清中血清蛋白，白蛋白和球蛋白水平变化的是归因于益生菌的短期现象。

5.MIX组的保护率高于其他组，可能是因为益生菌的配比与先天免疫反应或升高的免疫相关基因的表达密切相关。

优点:

- 1.分析较为全面，是一篇基础知识丰富的文章。
- 2.方法介绍较多，为以后自己设计实验提供参考。
- 3.文章旁征博引，参考内容很多。

缺点:

- 1.一些数据出现的结果未给出解释。
- 2.讨论中只是说有人做出同样的结果，但具体原因未解释。

# 谢谢

请各位老师批评指正！