



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102006785 A

(43) 申请公布日 2011.04.06

(21) 申请号 200980113026.4

A23K 1/16(2006.01)

(22) 申请日 2009.02.17

(30) 优先权数据

61/029,348 2008.02.17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.10.13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/001166 2009.02.17

(87) PCT申请的公布数据

WO2009/100950 EN 2009.08.20

(71) 申请人 华扩达动物科学 (I.P.3) 有限公司

地址 中国香港九龙尖沙咀梳士巴利道 20 号
新世界中心西翼写字楼 6 字楼 613 室

(72) 发明人 F · 希

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 陈迎春

(51) Int. Cl.

A23K 1/18(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 3 页

(54) 发明名称

改善虾健康的材料和方法

(57) 摘要

本发明提供用于改善有壳的水生动物健康的方法。在具体实施方案中, 本发明提供用于加速和/或增加虾生长; 改善免疫性; 和增强有壳的水生动物生育力的方法。为此, 本发明提供了向虾施用半胱胺化合物的材料和方法。

1. 包含半胱胺或其盐、载体、有壳的水生动物饲料和维生素 E 的组合物,其中半胱胺或其盐以组合物的大约 0.01%至 10%存在。
2. 权利要求 1 的组合物,其中半胱胺是半胱胺盐酸化物。
3. 权利要求 1 的组合物,其中半胱胺是半胱胺盐酸化物并且其中组合物包含每吨组合物大约 250-500 克半胱胺盐酸化物。
4. 权利要求 1 的组合物,包含 β -环糊精。
5. 改善太平洋白虾(凡纳滨对虾)抗感染的免疫性的方法,其中该方法包含向虾施用包含有效量半胱胺或其盐的组合物。
6. 权利要求 5 的方法,其中感染选自 Penaeid 虾的白斑综合征杆状病毒复合体; Penaeid 虾的黄头病毒疾病(YHD);和培养虾的弧菌属物种病(弧菌病)。
7. 权利要求 5 的方法,其中组合物包含半胱胺盐酸化物。
8. 权利要求 7 的方法,其中所施用半胱胺盐酸化物的剂量为每克虾每天大约 1-20 微克半胱胺盐酸化物。
9. 权利要求 7 的方法,其中所施用半胱胺盐酸化物的剂量为每克虾每天大约 3-15 微克的半胱胺盐酸化物。
10. 权利要求 5 的方法,其中组合物还包含 β -环糊精。
11. 权利要求 5 的方法,其中组合物包含 Aquanin plus。
12. 权利要求 11 的方法,其中组合物包含至少 0.05%的 Aquanin plus。
13. 权利要求 12 的方法,其中组合物包含至少 0.1%的 Aquanin plus。

改善虾健康的材料和方法

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2008 年 2 月 17 日提交的美国临时申请系列号 No. 61/029, 348 的权益, 所述临时申请完整引入本文作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 世界人口正在快速增加, 导致对海产品需求的同步增加。而且, 最近证明有壳的水生动物之有益特性的研究, 使得需求进一步增加 (见 Takezaki, T. 等人, “Diet and lung cancer risk from a 14-year population-based prospective study in Japan: with special reference to fish consumption,” *Nutr Cancer*, 45(2) :160-7(2003); 和 Su, X. 等人, “Omega-3 polyunsaturated fatty acid content in different edible portions of commercial scallop,” *Asia Pac J Clin Nutr.*, 12 Suppl :S63(2003))。

[0005] 已经开发了多种方法尝试缩小海产品供应和需求之间的差距。例如, 现在在水产养殖中生产很多不同有壳的水生动物物种。一些物种在完整生活周期培养, 而另一些物种从野生收获的种子进行培养。还有一些物种是在孵卵所中饲养并释放到开放水域用于以后收获。不幸的是, 使用目前的方法生产销售规模的有壳的水生动物在时间和运作上的成本非常昂贵。

[0006] 对于大多数有壳的水生动物而言生活周期漫长。同样地, 疾病和污染的水对任何有壳的水生动物水产养殖、孵卵所和农场都是威胁。在有壳的水生动物中大多数疾病由机会致病菌引起, 机会致病菌即在衰弱或应激的有壳的水生动物中导致疾病的细菌。微观海洋生物 (如产生被称为蛤贝毒 (paralytic shellfish poison, PSP) 毒素的单细胞甲藻) 可在暴露的有壳的水生动物中累积并对最终消费者有害。

[0007] 疫苗和抗生素是两种可获得的用于保护有壳的水生动物抵抗疾病的方法。药物 (即抗生素、疫苗等等) 的使用很昂贵, 在水产养殖中不得不大大减少, 以避免环境危害和发生抗药性的风险。因此, 存在持续的增强有壳的水生动物免疫原性的需求。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明提供用于改善有壳的水生动物健康的材料和方法。特别地, 本发明提供材料和方法用于: 加速和 / 或增加有壳的水生动物生长; 改善对疾病和其它污染物的免疫; 和 / 或增加幼虫产生和存活的成功率。

[0010] 本发明提供用于改善有壳的水生动物 (如虾) 健康的方法, 通过向有壳的水生动物施用半胱胺化合物进行。特别地, 向有壳的水生动物引入有效量的半胱胺化合物以促进有壳的水生动物的健康、生长和种群数量。例如, 向有壳的水生动物施用半胱胺或多种半胱胺盐。

[0011] 在优选的实施方案中, 使用半胱胺促进虾的健康。在本文特别说明的实施方案中, 给虾喂食环糊精制剂中的半胱胺。本文特别说明的是使用 Aquanin Plus 来改善虾的健康。

[0012] 附图简述

[0013] 图 1 的图说明接受不同浓度 Aquanin Plus 0、10、20、30、40 和 50 天后, 对虾 (*Vannamei*) 的酚氧化酶 (分钟 / 毫克蛋白质) 的量。

[0014] 图 2 的图说明接受不同浓度 Aquanin Plus 0、10、20、30、40 和 50 天后,对虾的血细胞 ($\times 10^6$ 细胞 / 毫升) 的量。

[0015] 图 3 的图说明接受不同浓度 Aquanin Plus 0、10、20、30、40 和 50 天时,对虾进行外源病原体吞噬的白细胞 (吞噬细胞) 的百分数。

[0016] 图 4 的图说明在接受不同浓度 Aquanin Plus 0、10、20、30、40 和 50 天时,与对照组比较对虾血清哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 浓度的降低。

[0017] 图 5 的图说明在接受不同浓度的 Aquanin Plus 50 天后,用 WSSV 激发后对虾的存活百分比。

[0018] 图 6 的图说明在接受不同浓度的 Aquanin Plus 60 天后,对虾的存活百分比。

[0019] 图 7 的图说明在接受不同浓度的 Aquanin Plus 60 天后,对虾重量增加的差别。

[0020] 发明详述

[0021] 本发明提供独特的方法用于改善有壳的水生动物的健康。特别地,本发明提供用于加速和 / 或增加有壳的水生动物中的生长 ;改善对疾病和其它污染物的免疫性 ;和 / 或增加幼虫产生和存活的成功率的材料和方法。

[0022] 特别地,本发明涉及向有壳的水生动物施用有效促进有壳的水生动物健康、生长和种群数量的量的半胱胺化合物。本发明的一个实施方案涉及改善有壳的水生动物的健康的组合物的用途,其中组合物包含半胱胺化合物。本文特别示例性说明使用环糊精制剂中的半胱胺。优选地,使用 β -环糊精半胱胺盐酸化物促进虾的健康。

[0023] 如本文所考虑的,有壳的水生动物包括具有可包含在壳内的柔软、未分节躯体的水生无脊椎动物。例如,提及有壳的水生动物包括甲壳动物如对虾、虾、螯虾、龙虾、蟹、大螯虾 ;和软体动物如鲍鱼、青蛤、短齿蛤、牡蛎、扇贝、章鱼、鱿鱼和蜗牛。本文提及有壳的水生动物也可包括海龟、海胆和海参。

[0024] 在本文使用时,术语“有壳的水生动物的健康”通常是指影响有壳的水生动物整体状况的多种参数。有壳的水生动物健康所依据的具体参数包括 :有壳的水生动物的大小 (或生长) ;生活周期时间的长度 ;对疾病和污染暴露充分应对的免疫系统的能力 ;和繁殖后代的能力。如本文所考虑的,改善有壳的水生动物的健康可包括降低有壳的水生动物的死亡率 ;增加抗体滴度 / 淋巴细胞数量 ;和 / 或增加细胞因子分泌。

[0025] 在本文使用时,“同时施用”和“同时地施用”包括施用适合与本发明方法 (施用半胱胺化合物) 一起使用的化合物或方法以改善有壳的水生动物的健康。例如,可将维生素、抗生素和 / 或疫苗与本发明的材料和方法同时施用以改善有壳的水生动物的健康。

[0026] 根据本发明,化合物可与半胱胺化合物混合提供,如在水性乳剂中 ;或者化合物和半胱胺作为单独的化合物提供,如例如,连续、同时或在不同时间施用单独的组合物。优选地,如果用于改善有壳的水生动物健康的半胱胺化合物和已知试剂 (或治疗方法) 单独施用,它们相互之间在施用时间上不能间隔太远以致于半胱胺化合物和已知试剂 (方法) 不能相互作用。

[0027] 在本文使用时,提及的“半胱胺化合物”包括半胱胺和半胱胺盐。所考虑的半胱胺盐包括,但不限于,半胱胺盐酸化物、cysteamine chlorohydrate、半胱胺醋酸盐、半胱胺磷酸盐、半胱胺硝酸盐、半胱胺溴化物、半胱胺酒石酸氢盐和半胱胺氟化物。还包括在本发明的范围内的是半胱胺类似物、衍生物、缀合物和代谢产物,其具有本文描述的改善有壳的水

生动物健康的能力。多种半胱胺的类似物、衍生物、缀合物和代谢产物是本领域技术人员熟知的并可被容易地使用,包括例如,如在美国专利 6,521,266 ;6,468,522 ;5,714,519 ;和 5,554,655 所述化合物、组合物和传送方法。

[0028] 在本文使用时,术语“有效量”是指可诱导所需生物应答的必需量。按照本发明,半胱胺化合物的有效量是改善有壳的水生动物健康的必需量。在优选实施方案中,半胱胺化合物的有效量是加速和 / 或增加有壳的水生动物生长 ;改善对疾病和其它污染物的免疫应答 ;增强生育力 ;和 / 或增加幼虫产生和存活成功的必需量。例如,有壳的水生动物健康的改善可以是 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、250% 或 300% 的生长加速和 / 或增加 ;对疾病和 / 或污染物免疫应答的改善 ;和 / 或在生育力的增强。更特别地,改善有壳的水生动物健康是由于降低有壳的水生动物死亡率 ;增加的抗体滴度 / 淋巴细胞数量 ;和增加的细胞因子分泌。

[0029] 在一些实施方案中,半胱胺化合物是半胱胺盐酸化物,并且组合物中有效量是组合物的大约 20-40%。在其他实施方案中,半胱胺盐酸化物在组合物中以大于或等于组合物的 0.01%、0.05%、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40% 或 40% 以上的量存在。在另一些实施方案中,半胱胺盐酸化物在组合物中以大于或等于每千克组合物中 15 克、20 克、25 克或 30 克的量存在。在其他实施方案中,半胱胺盐酸化物在组合物中以大于或等于每千克组合物中 200 克、225 克、250 克、275 克或 300 克的量存在。在另一些实施方案中,半胱胺的存在可以是每吨饲料中大约 150 克至大约 1,000 克,更优选地在每吨饲料中大约 200 克和 900 克之间,和甚至更优选地在在每吨饲料中 250 克和 500 克之间。在另一些实施方案中,半胱胺盐酸化物在组合物中以每吨饲料中大约 270 克存在。

[0030] 加速的和 / 或增加的生长

[0031] 在本发明的一个实施方案中,向有壳的水生动物施用半胱胺化合物以加速和 / 或增加生长。如本文所考虑的,“加速和 / 或增加生长”是指在正常生活周期中缩短发育期和 / 或增加有壳的水生动物的总体大小的能力。在优选的实施方案中,向虾施用半胱胺盐酸化物以加速和 / 或增加生长。

[0032] 改善免疫应答

[0033] 在另一实施方案中,向有壳的水生动物施用半胱胺化合物以改善对疾病和其它污染物的免疫应答。如本文所考虑的,“改善免疫”是指促进有壳的水生动物的免疫系统从而更有效地攻击有害的微生物和 / 或污染物,并治愈由于暴露于此类微生物和 / 或污染物而引起的有壳的水生动物的任何损害。通过改善免疫,本发明也增加幼虫产生和存活成功的可能性。在优选的实施方案中,向虾施用半胱胺化合物以改善对疾病和其它污染物的免疫应答。

[0034] 根据本发明,将半胱胺化合物引入至有壳的水生动物(如虾)能够:(1) 积极增加有壳的水生动物的免疫从而促进对疾病和 / 或污染物的抵抗力 ;和 / 或 (2) 治疗和促进从目前暴露于有害微生物和 / 或污染物中快速恢复。

[0035] 如本文所考虑的,本发明改善有壳的水生动物对多种微生物和污染物的免疫应答。例如,本发明改善牡蛎对多种疾病和病原体的免疫应答,多种疾病和病原体包括,但不限于,牡蛎盘病毒疾病(Oyster Velar Virus Disease, OVVD) ;葡萄牙牡蛎的鳃病 ;牡蛎

的血细胞感染病毒 (Haemocytic Infection Virus) 疾病;牡蛎的疱疹类型病毒疾病;牡蛎的细胞外巨大“立克次氏体”;牡蛎的海水伯金斯虫 (*Perkinsus marinus*) 病 (“Dermo” 疾病);欧洲扁平牡蛎的伯金斯虫属物种;牡蛎的肾脏球虫目 (Kidney Coccidia);牡蛎的 *Minchinia armoricana*;牡蛎的马尔太虫病 (Marteiliosis) (Aber 疾病);牡蛎的 *Marteilioides chungmuensis*;牡蛎的 *Bonamia ostreae*;牡蛎的卵细胞疾病;幼牡蛎的侵袭性纤毛虫;牡蛎的 *Mytilicola intestinalis* 病 (红色蠕虫疾病);牡蛎的血细胞瘤形成 (Haemocytic Neoplasia);东方牡蛎的幼年病;牡蛎的病毒性配子母细胞肥大 (Viral Gametocytic Hypertrophy);牡蛎的诺卡菌病;牡蛎的 *Mikrocytos machine* 病 (Denman Island 疾病);牡蛎的尼氏单孢子虫 (*Haplosporidium nelsoni*) (MSX);牡蛎的沿岸单孢子虫 (*Haplosporidium costale*) (SSO);牡蛎的绞扭伤壳菌 (*Ostracoblabe implexa*) 病 (外壳疾病);牡蛎吸虫疾病;牡蛎的东方贻贝蚤 (*Mytilicola orientalis*) (红色蠕虫);牡蛎鳃上的寄生挠足虫;牡蛎的豆蟹 (Pea Crab);牡蛎的马佩奎蚝 (*Malpeque*) 疾病;珍珠牡蛎的组病毒样病毒 (Papova-Like Virus) 感染;新西兰牡蛎的顶复门寄生虫 (Apicomplexan Parasite);珍珠牡蛎的单孢子虫属物种;牡蛎的 *Marteilia sydneyi*;牡蛎的 *Marteilioides branchialis*; *Bonamia exitiosus* (新西兰拖网牡蛎的波纳米欧病 (Bonamiasis)); *Bonamia* sp. (澳大利亚牡蛎的波纳米欧病);牡蛎的 *Mikrocytos roughleyi* (澳大利亚冬季疾病);拖网牡蛎的微孢子虫病;牡蛎的立克次氏体样和衣原体样生物;牡蛎的弧菌属物种病 (幼虫和幼牡蛎的弧菌病);幼牡蛎的铰合韧带疾病;幼虫牡蛎的消化道嵌塞;牡蛎的簇虫寄生;牡蛎的六鞭虫病;牡蛎的裂冠纤毛虫属样纤毛虫;牡蛎的 *Sphenophyra* 样纤毛虫;牡蛎的鳃车轮虫 (Trichodinids);牡蛎的 *Sirolopidium zoophthorum* 病 (幼虫霉菌病);牡蛎的鳃涡虫纲;牡蛎的线虫寄生;牡蛎的壳钻孔多毛虫 (Shell-boring Polychaetes);牡蛎的壳钻孔海绵状动物 (Shell-burrowing Sponges) 和牡蛎的 *Pyramidellid* Snail。

[0036] 在另一个例子中,本发明能够改善短齿蛤对多种疾病和病原体的免疫应答,多种疾病和病原体包括,但不限于,短齿蛤的病毒样疾病;短齿蛤的单孢子虫 (*Haplosporidian*) 感染;短齿蛤的 *Marteilia refringens/maurini*; *Steinhausia mytilovum* 病 (短齿蛤卵细胞疾病);短齿蛤外壳的光养 Endolity (Phototrophic Endolity) 侵入;短齿蛤的 *Proctoeces maculates* 吸虫疾病;短齿蛤鳃涡虫纲 (*Gill Turbellaria*);短齿蛤的 *Mytilicola intestinalis* 病 (红色蠕虫疾病);短齿蛤的肾脏球虫目;短齿蛤的 *Bucephalid* 吸虫疾病;短齿蛤的东方短齿蛤蚤 (*Mytilicola orientalis*) (红色蠕虫);短齿蛤的豆蟹;短齿蛤的血细胞瘤形成;短齿蛤的 *Mytilicola porrecta* (红色蠕虫);短齿蛤的立克次氏体样和衣原体样生物;短齿蛤的簇虫寄生;短齿蛤的细胞内纤毛虫;短齿蛤的 *Phenophyra* 样纤毛虫;短齿蛤的 *Ancistrum mytili* 鳃纤毛虫;短齿蛤的霉菌角质层腐肉 (Mycotic Periostracal Sloughing) 形成;短齿蛤的吸虫囊蚴;短齿蛤鳃上的寄生挠足虫;短齿蛤的壳钻孔多毛虫 (Shell-boring Polychaetes);和短齿蛤的壳钻孔海绵状动物 (Shell-burrowing Sponges)。

[0037] 在又一个例子中,本发明能够改善青蛤和鸟蛤对多种疾病和病原体的免疫应答,多种疾病和病原体包括,但不限于,青蛤的病毒感染;马尼拉青蛤的褐色环疾病 (Brown Ring Disease);青蛤和鸟蛤的伯金斯虫属;青蛤的单孢子虫 (*Haplosporidian*) 感染;

青蛤的微孢子虫 (Microsporidiosis); 幼象拔蚌 (Larval Geoduck Clam) 的阿米巴鞭毛体 (Amoeboflagellate) 疾病; 青蛤和鸟蛤的 *Mytilicola intestinalis* 病 (红色蠕虫疾病); 太平洋缢蛏 (Pacific Razor Clam) 的核内包涵体 X(NIX); 青蛤的肾脏球虫目; 青蛤的 QPX (未知的圆青蛤类寄生虫); 青蛤和鸟蛤的东方短齿青蛤蚤 (*Mytilicola orientalis*) (红色蠕虫); 青蛤和鸟蛤中的豆蟹; 青蛤的血细胞瘤形成; 青蛤的生殖腺瘤形成; 在葡萄牙青蛤的 Endonucleobiotic 细菌; 鸟蛤的支原体样感染; 青蛤的隐孢子虫病; 砗磲 (Giant Clam) 的马特贝属样寄生虫; 鸟蛤的阿米巴病; 青蛤和鸟蛤的立克次氏体样和衣原体样生物体; 青蛤的弧菌属物种病 (幼虫和幼青蛤的弧菌病); 幼青蛤的铰合韧带疾病; 青蛤和鸟蛤的簇虫寄生; 青蛤和鸟蛤的 *Sphenophyra* 样纤毛虫; 青蛤的派氏钩毛虫 (*Ancistrocoma pelseneeri*) 和 *A. myae* 纤毛虫; 青蛤和鸟蛤的鳃车轮虫属; 青蛤的 *Sirolpidium zoophthorum* 病 (幼虫霉菌病); 青蛤的涡虫纲; 青蛤和鸟蛤的吸虫囊蚴; 青蛤的壳钻孔多毛虫 (Shell-boring Polychaetes); 和青蛤和鸟蛤的虹吸蜗牛 (Siphon Snails)。

[0038] 在另一个例子中, 本发明能够改善扇贝对多种疾病和病原体的免疫应答, 多种疾病和病原体包括, 但不限于, 在亚洲日本扇贝的伯金斯虫属物种; 扇贝单孢子虫 (Haplosporidian); 扇贝的马特贝属物种; 扇贝鳃的育囊挠足虫; 扇贝中的豆蟹; 扇贝的细胞内细菌疾病; 扇贝的细菌脓肿损害; 扇贝的 *Perkinsus qugwadi* (SPX); 扇贝的肾脏球虫目; 扇贝的 *Perkinsus karlssoni*; 扇贝原生生物 G; 扇贝的微孢子虫 (Microsporidiosis); 扇贝的吸虫囊蚴; 扇贝的病毒样感染; 扇贝的衣原体病; 扇贝的立克次氏体样和衣原体样生物体; 扇贝的弧菌属物种病 (幼虫弧菌病); 扇贝的簇虫寄生; 扇贝的鳃车轮虫 (Trichodinids); 扇贝的鳃涡虫纲 (Turbellaria); 扇贝的的线虫寄生; 扇贝的壳钻孔多毛虫 (Shell-boring Polychaetes); 和扇贝的壳钻孔海绵状动物 (Shell-borrowing Sponges)。

[0039] 在另一个例子中, 本发明能够改善鲍鱼对多种疾病和病原体的免疫应答, 多种疾病和病原体包括, 但不限于, 鲍鱼的肾脏球虫目; 鲍鱼中的帚虫多毛感染 (Sabellid Polychaete Infestation) 疾病; 鲍鱼的鲍盘形虫 (*Labyrinthuloides haliotidis*); 鲍鱼的肌萎缩; 培养鲍鱼的水疱疾病; 鲍鱼的萎缩综合征; 鲍鱼的 *Perkinsus olseni*; 鲍鱼单孢子虫 (Haplosporidian) 寄生虫; 鲍鱼的真菌疾病; 鲍鱼的线虫寄生; 鲍鱼的细菌疾病; 鲍鱼相关的纤毛虫; 鲍鱼的吸虫囊蚴 (Trematode Metacercariae); 和鲍鱼的壳钻孔多毛虫 (Shell-borrowing Polychaetes)。

[0040] 在又一个例子中, 本发明能够改善海胆对多种疾病和病原体的免疫应答, 多种疾病和病原体包括, 但不限于, 海胆的线虫 (Nematode) 寄生; 秃头海胆疾病 (Bald-Sea-Urchin Disease); 海胆的 *Paramoeba invadens*; 海胆的斑点生殖腺疾病; 黑海胆瘟疫; 海胆的吸虫囊蚴; 和海胆的涡虫纲寄生。

[0041] 在又一个例子中, 本发明能够大螯虾改善对多种疾病和病原体的免疫应答, 多种疾病和病原体包括, 但不限于, 大螯虾的 *Paramoeba pernicioso* (副变形虫病); 大螯虾的高夫败血症; 大螯虾的 *Anophryoides haemophila* 病 (纤毛虫疾病); 大螯虾的 *Pseudocarcinonemertes homari*; 大螯虾的微孢子虫病 (Microsporidiosis); 挪威大螯虾的血钩虫属物种; 大螯虾的 *Carcinonemertes australiensis*; 大螯虾的寄生挠足虫; 大螯虾

的弧菌属物种病（幼大螯虾弧菌病）；大螯虾的几丁质水解细菌外壳疾病（Chitinolytic Bacterial Shell Disease）；大螯虾的簇虫寄生；大螯虾的链壶菌（Lagenidium）物种病（真菌疾病）；大螯虾的镰孢菌属物种病（真菌或烧伤斑疾病）；大螯虾的海壶菌（Haliphthoros）物种病（真菌疾病）；大螯虾中的线虫；大螯虾中的吸虫囊蚴；和大螯虾中的棘头虫幼虫。

[0042] 在又一个例子中，本发明能够改善虾和对虾对多种疾病和病原体的免疫应答，多种疾病和病原体包括，但不限于，长额虾科（Pandalid）虾的立克次氏体样感染；长额虾科虾的原生生物病原体（SPP）；虾和对虾的 Sylon（甲头目动物疾病）；Penaeid 虾的对虾杆状病毒（Baculovirus penaei）病（BP 病毒疾病）；Penaeid 虾的斑节对虾杆状病毒（Monodon Baculovirus）（MBV）疾病；Penaeid 虾的中肠腺坏死（Baculoviral Midgut-gland Necrosis）（BMN）；Penaeid 虾的白斑综合征杆状病毒复合体病（White Spot Syndrome Baculovirus Complex）；虾和对虾的肝胰腺小型病毒（Hepatopancreatic Parvovirus, HPV）疾病；Penaeid 虾的传染性皮下和造血系统坏死病毒（Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus, IHNV）；Penaeid 虾的淋巴器官细小样病毒疾病（Lymphoidal Parvo-like Virus Disease）；Penaeid 虾的淋巴器官空泡病毒（Lymphoid Organ Vacuolization Virus, LOVV）；Penaeid 虾的呼肠孤样病毒（Reo-like Virus, REO）疾病；Penaeid 虾的桃拉综合征病毒（Taura Syndrome Virus）；美洲 Penaeid 虾的弹状病毒疾病（Rhabdovirus Disease）；Penaeid 虾的黄头病毒疾病（Yellow-head Virus Disease, YHD）；Penaeid 虾的立克次氏体感染；Penaeid 虾的引起坏死的肝胰（Necrotizing Hepatopancreatic）；Penaeid 虾的分枝杆菌病；培养的 Kurama 对虾的杀对虾弧菌（*Vibrio penaeicida*）；淡水虾的幼虫细菌坏死；Penaeid 虾的单孢子虫（Haplosporidian）感染；Penaeid 虾的簇虫疾病；Penaeid 虾的纤毛虫疾病；Penaeid 虾的消化道和神经综合征（GNS）；淡水虾的幼虫中期疾病（MCD）；Penaeid 虾的红色疾病；培养虾的弧菌属物种病（弧菌病（*Vibrio* Disease））；虾和对虾的几丁质水解细菌外壳疾病（Chitinolytic Bacterial Shell Disease）；虾和对虾的丝状细菌疾病；虾和对虾的微孢子虫病（Microsporidiosis）（棉花虾疾病）；虾和对虾的幼虫霉菌病；虾和对虾的镰孢菌属物种（真菌疾病）；长额虾科虾的线形动物寄生；和虾和对虾的黑鳃综合征。

[0043] 在又一个例子中，本发明能够改善蟹对多种疾病和病原体的免疫应答，其中多种疾病和病原体包括，但不限于，蟹的病毒疾病；蟹的立克次氏体和衣原体；蟹的 Haplosporidiosis；恶性热副变形虫（*Paramoeba pernicioso*）（灰色蟹疾病）；大西洋蟹的血卵涡鞭虫（*Hematodinium perezii*）和血钩虫属物种（*Hematodinium* sp.）；蟹的几丁质水解真菌疾病（Black Mat 综合征）；蟹的大蟹感染纽虫物种（*Carcinonemertes* spp.）；蟹的蟹栖异阿脑虫物种（*Mesanothryx* spp.）病（纤毛虫疾病）；血钩虫属物种（苦蟹病（*Bitter Crab Disease*））；蟹的甲头目动物寄生虫（Rhizocephalan Parasites）；在澳大利亚中蟹的血钩虫属物种；蟹的几丁质水解细菌外壳疾病；蟹的微孢子虫病（Microsporidiosis）；蟹的吸虫囊蚴；蟹的棘头虫寄生；蟹的线形动物寄生；和蟹的链壶菌物种（*Lagenidium* spp.）病（真菌疾病）。

[0044] 在又一个例子中，本发明能够改善螯虾对多种疾病和病原体的免疫应答，多种疾病和病原体包括，但不限于，欧洲螯虾的胶孢子虫孢子物种（*Psorospermium* spp.）（原生动

物疾病) ; 螯虾的 Therlohaniasis ; 螯虾的烧伤斑疾病 (Burn Spot Disease) (真菌疾病) ; 螯虾瘟疫 (真菌疾病) ; 蓝色螯虾的杆状病毒 ; 螯虾的立克次氏体 ; 螯虾的诺卡菌属物种 (细菌疾病) ; 螯虾的变形杆菌属或假单胞菌属细菌败血症 ; 螯虾的几丁质水解细菌外壳疾病 ; 美洲螯虾的胶孢子虫孢子物种 (Psorospermium sp.) (原生动感染) ; 螯虾的水霉属物种 (Saprolegnia spp.) (真菌疾病) ; 螯虾中的吸虫 ; 螯虾的涡虫纲感染 ; 和螯虾的蛭蚓目 (Branchiobdellida) 环节动物寄生。

[0045] 根据本发明, 向有壳的水生动物施用半胱胺化合物可以通过本领域技术人员目前已知或预期已知的任何适当方法和技术完成。本文具体的示例是单独地或者与其它化合物或方法同时使用将半胱胺化合物引入至含有待治疗的有壳的水生动物水中。半胱胺化合物可以作为组合物被引入, 以任何有效的形式包括在液体中 (即溶剂、油), 在水性混合物中, 在水性乳剂中, 在固体载体或基质中, 或其它运载体, 只要所述运载体与向含有待治疗有壳的水生动物水中所施用的半胱胺化合物相容并且不对有壳的水生动物产生不利影响。

[0046] 在包含半胱胺化合物的组合物中也可使用多种适当佐剂。例如, 乳化剂、除泡剂 (或消泡剂)、抗氧化剂、维生素、矿物、防腐剂、着色剂等等, 也包括在本发明的组合物中。在一个实施方案中, 佐剂以较少的量存在于在本发明的组合物中, 即按体积计算少于大约 5%, 优选地, 按体积计算少于 1%。在其他实施方案中, 在本发明的组合物中存在较大量的佐剂, 即按体积计算至多 70%。所有此类佐剂对于正在治疗的有壳的水生动物应该是无害且无毒的。

[0047] 在一些实施方案中, 在本发明的组合物中存在维生素。在优选的实施方案中, 存在于组合物 (在任何饲料的添加之前) 中的维生素 E 在大约 0.05% 至 1.0% 之间。在另一实施方案中, 组合物中的维生素 E 以大于或等于 0.1% 的量存在。在本发明的又一实施方案中, 组合物中的维生素 E 以每千克组合物大于或等于 0.1 毫克的量存在。在另一实施方案中, 其中 1 吨的饲料加入到组合物中, 组合物中的维生素 E 以每吨饲料大于或等于 10 毫克的量存在。

[0048] 根据本发明, 适当的乳化剂 (即表面活性剂或分散剂) 可以是阳离子、阴离子、非离子或两性乳化剂。优选的乳化剂包括, 例如, 广泛可得的食物级乳化剂。在本发明中使用的适当乳化剂的一些类型的概述包括在 G. Charalambous 等人编辑, Food Emulsifiers—Chemistry, Technology, Functional Properties and Applications, Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, N. Y. (1989) 第 1-8 页 A. J. St. Angelo, “A Brief Introduction to Food Emulsion and Emulsifiers” 中所列出的那些。

[0049] 在一个实施方案中, 提供了包含半胱胺化合物和载体 (如包含化合物宿主材料) 的组合物。据信通过提供载体如包含化合物宿主材料, 稳定的半胱胺化合物分子能够被安全的传送至有壳的水生动物而不会诱发毒性。另外, 此类载体材料可包括包衣材料 (即肠包衣), 其允许在碱性环境中如在肠内溶解包衣。根据本发明, 所使用的载体材料的例子包括, 但不限于, 包含化合物宿主材料、微晶纤维素、淀粉和海藻酸钠。

[0050] 在一些实施方案中, 存在于在本发明的组合物中的载体材料包含: 以大约 10-30 重量% 存在的微晶纤维素; 以大约 40-50 重量% 存在的淀粉; 和以大约 1-5 重量% 存在的海藻酸钠。在有关的实施方案中, 组合物中的微晶纤维素以大于或等于 20% 的量存在, 组合

物中的淀粉以大于或等于 43% 的量存在,和组合物中的海藻酸钠以大于或等于 3.5% 的量存在。在又一本发明的有关的实施方案中,组合物(在饲料添加至组合物之前)中的微晶纤维素以大于或等于每千克组合物 20.0 克的量存在;淀粉以大于或等于每千克组合物 43.0 克的量存在;和海藻酸钠以大于或等于每千克组合物 3.5 克的量存在。在另一实施方案中,当一吨的饲料添加至组合物中时,微晶纤维素以大于或等于每吨饲料 200 克的量存在;组合物中的淀粉以大于或等于每吨饲料 430 克的量存在;和海藻酸钠以大于或等于每吨饲料 35 克的量存在。

[0051] 根据本发明,可以使用的包合化合物宿主材料包括在美国专利申请系列号 20040033985 中公开的那些,该申请完整引入本发明作为参考。所考虑的包合化合物宿主材料包括蛋白质(如白蛋白)、冠醚、聚氧化烯、聚硅氧烷、沸石、胆苯烯胺(cholestyramine)、考来替泊(colestipol)、考来维仑(colesevelam)、2-甲基咪唑和 1-氯-2,3-环氧丙烷的聚合物(colestimide)、司维拉姆(sevelamer)、纤维素衍生物、葡聚糖衍生物、淀粉、淀粉衍生物及其药学上可接受的盐。所考虑的纤维素衍生物和葡聚糖衍生物包括 DEAE-纤维素、胍基乙基纤维素或 DEAE-Sephadex。将包括在本发明组合物的中的有利的淀粉或淀粉衍生物包括环糊精、回生淀粉(retrograded starch)、降解淀粉、回生淀粉和降解淀粉的组合、疏水淀粉、淀粉酶、淀粉-二乙氨基乙醚和淀粉-2-羟基乙醚。

[0052] 根据本发明,优选的包合化合物宿主材料包括,但不限于,环糊精和/或其衍生物,即甲基-β-环糊精、羟丙基-β-环糊精、羟乙基-β-环糊精、聚环糊精、乙基-β-环糊精和分枝环糊精。本领域技术人员应当理解,依据本发明,可以利用任何环糊精或环糊精的混合物、环糊精聚合物或修饰的环糊精。例如,β-环糊精在药学组合物中被广泛的用作增溶剂、稳定剂和惰性赋形剂(见美国专利号 6,194,430;6,194,395;和 6,191,137,其中的每个专利完整引入本文作为参考)。环糊精可以从 Wacker Biochem Inc., Adrian, Mich. 或 Cerestar USA, Hammond, Ind. 以及其它销售商获得。

[0053] 环糊精的通式是 $(C_6O_5H_9)_n$ 。β-环糊精是包含七个单元 α-(1,4) 连接的 D-吡喃葡萄糖单元的环状化合物,作为能形成包合配合物的配合剂起作用并同时具有增溶特性(见美国专利号 6,194,395;也见 Szejtli, J. Cyclodextrin Technol, 1988)。使用环糊精或其衍生物形成的包合配合物保护成分(即半胱胺化合物)免于蒸发的损失,免于受到氧气、酸、可见光和紫外线攻击和免于分子内-和分子间的反应。本发明的组合物中包合化合物宿主材料的含量范围可以为大约 1 至 80 重量%。优选地,本发明的组合物中包合化合物宿主材料的含量范围可以为大约 1 至 60 重量%。所用的包合化合物宿主材料的实际量主要取决于制备本发明组合物所使用的半胱胺化合物和额外治疗剂的实际含量。

[0054] 在本发明的一些实施方案中,包合化合物宿主材料是 β-环糊精,其在饲料的添加之前以组合物的大约 1% 至 20% 存在。在另一个实施方案中,β-环糊精在组合物中以大于或等于 5% 的量存在。在本发明的又一实施方案中,β-环糊精在组合物中以大于或等于每千克组合物 5.0 克的量存在。在另一实施方案中,当一吨的饲料添加至组合物中时,β-环糊精在组合物中以大于或等于每吨饲料 50 克的量存在。

[0055] 需要时,在向包含有壳的水生动物的水中引入半胱胺化合物后,可以使用测量或混合泵或联机混合器(即混合阀、喷嘴或管口)、充气器或其它本领域技术人员已知的装置完成半胱胺化合物在水中的直接分散。

[0056] 在一个实施方案中,将包含半胱胺化合物的水性混合物、乳剂或分散物引入含有待处理有壳的水生动物的水中。本发明的水性混合物、乳剂或分散物可含有大约0.1%至大约95%的半胱胺化合物,其中所有百分数基于组合物的终体积按体积计算。根据本发明,当将组合物加入到含有待处理有壳的水生动物的水环境时,组合物可进一步稀释。所使用半胱胺化合物的量可根据待处理有壳的水生动物的健康(即大小、年龄等等)而改变。

[0057] 根据本发明,包含半胱胺化合物的组合物可与有壳的水生动物饲料同时施用。在一个实施方案中,在喂食有壳的水生动物之前,将包含半胱胺化合物的组合物与有壳的水生动物的饲料混合。在优选的实施方案中,将包含 β -环糊精半胱胺盐酸化物的组合物与固体饲料(即下沉或漂浮饲料)混合物混合并引入至待处理的虾。本发明的饲料混合物可含有大约0.1%至大约95%的半胱胺化合物,其中所有百分数基于组合物的终体积按体积计算。所使用半胱胺化合物的量可根据待处理有壳的水生动物的健康(即大小、年龄等等)而改变。

[0058] 根据本发明,本发明的组合物还包含有壳的水生动物的饲料。在一些实施方案中,为了处理虾,将包含半胱胺化合物、载体和维生素E的组合物与虾饲料混合。在有关实施方案中,有壳的水生动物饲料是大约1吨的虾饲料。在另一些实施方案中,组合物包含每吨虾饲料大约200-400克的半胱胺化合物(如半胱胺盐酸化物)。在本发明的另一些实施方案中,组合物包含每吨虾饲料大约270克的半胱胺化合物(如半胱胺盐酸化物)。在又一实施方案中,每天向普通虾施用大约350-450微克的组合物,该组合物包含大约20-30%半胱胺化合物,大约1-20%环糊精,和大约0.05-1.0%维生素E,其中普通虾的大小是大约12克。

[0059] 本发明半胱胺化合物可根据用于制备向有壳的水生动物施用的组合物的已知方法配制。该制剂可存在于单剂量或多剂量容器例如密封的安瓿和小瓶中,可将其贮藏在冷冻干燥的(低压冻干的)条件中,在使用前仅需要无菌液体载体例如水。可从无菌粉末、颗粒、片剂等准备临时的溶液和混悬液。应当理解除了上面特别提到的成分,关于所讨论制剂的类型,本发明的制剂可包括其它本领域常规试剂。

[0060] 在本发明的一些方法中,引入的半胱胺的有效量取决于如水pH、硬度、碱度、温度等因素。根据本发明的一个实施方案,施用半胱胺的有效量是每天每克有壳的水生动物大约1-20微克半胱胺盐(如半胱胺盐酸化物)。在有关实施方案中,每天向每克虾施用大约1-20微克半胱胺盐酸化物。在又一有关的实施方案中,每天向每克虾施用大约3-15微克的半胱胺盐酸化物。在又一有关的实施方案中,每天向每克虾施用大约5-10微克的半胱胺盐酸化物。

[0061] 根据本发明,处理的有壳的水生动物包括在有限制的水域如运输容器、贮存罐、水族馆、水池或小池塘,大片水域和那些在无限制水域如河流或海滩附近的那些。

[0062] 以下是示例性说明实施本发明程序的例子。这些例子不应解释为限制。除非另有说明,所有百分数按重量计算,所有的溶剂混合物比例按体积计算。

[0063] 实验实施例

[0064] 目前,太平洋白虾,即凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),原产于中美洲和南美洲,是泰国、中国台湾和中国大陆培养的主要虾种。自从2001年以来,虾农在养殖的凡纳滨对虾中经历了与产量下降相关的疾病问题。

[0065] 来自Walcom Bio-Chemicals Industrial Limited的Aquanin Plus(商品名)含

有至少 27% 的 β -环糊精半胱胺盐酸化物和 0.1% 的维生素 E。为了下列实验的目的,在 1 千克 Aquanin Plus 中存在 270 克的半胱胺。在一个实施方案中,根据本发明,300ppm 直至 4000ppm 的 Aquanin Plus 在治疗虾中是有效的。下列实施例提供了对于在虾培养中用于增加生长、存活和免疫应答的 Aquanin Plus 浓度的理解。

[0066] 实验 1

[0067] 从泰国尖竹汶府 (Chantaburi) 商业农场获得的凡纳滨对虾 (11.6±0.5 克) 实验前在实验室中顺应两周。为了确定饮食中施用 Aquanin Plus 的生长促进作用和免疫刺激效应,在三种处理 (六次重复 / 处理) 中进行试验。每次重复由在 500 升储水池中 25 只虾组成。虾每天以 3% 体重的含有梯度水平的 Aquanin Plus (0%、0.05% 和 0.1% 的饲料; 例如,0.1% Aquanin Plus 指将 1 千克 Aquanin Plus 添加到 1 吨饲料中,0.05% Aquanin Plus 指将 0.5 千克 Aquanin Plus 添加到 1 吨饲料中) 的压片饲料一天四次喂食,喂食 50 天。在实验中,水质参数维持如下:温度在 28±1°C, pH 在 7.8-8.0, 盐度在 25ppt。对数据进行单因素方差分析之后进行 Duncan' s 多范围检验。

[0068] 施用饮食 50 天后,用 0.1% Aquanin Plus 喂养的虾在体重百分数增加上显著高于 ($P < 0.05$) 用 0.05% Aquanin Plus 和对照组喂养的虾 (表 1)。

[0069]

表 1. 用 0%、0.05% 和 0.1% Aquanin Plus 喂食 50 天后, 凡纳滨对虾的重量增加和存活百分数。

处理	对照	Aquanin Plus	
	0%	0.05%	0.1%
%重量增加	52.69 ± 3.45 ^a	52.29 ± 5.05 ^a	65.45 ± 4.84 ^b
%存活	74.40 ± 6.07 ^a	88.00 ± 6.32 ^b	95.20 ± 1.79 ^b

[0070] 结果表明用含有 0.1% Aquanin Plus 饮食喂食的虾与 0.05% Aquanin Plus 和对照组饮食喂食的虾相比具有显著更高 ($P < 0.05$) 的总血细胞数 (THC)、吞噬百分数和酚氧化酶活性 (表 2)。

[0071]

表 2. 用不同水平 Aquanin Plus 喂食 50 天后, 凡纳滨对虾的总血细胞数 (THC)、吞噬百分数、酚氧化酶活性和细菌活性。

	对照	Aquanin Plus	
	0%	0.05%	0.1%

[0072]

THC(x 10⁶ 细胞/毫升)	11.13 ± 0.51^a	13.38 ± 0.29^a	15.98 ± 0.29^b
%吞噬	25.75 ± 1.34^a	27.86 ± 1.64^a	33.61 ± 0.85^b
酚氧化酶活性 (单位/分钟/毫克蛋白)	307.08 ± 18.92^a	326.65 ± 19.98^a	441.98 ± 32.63^b
细菌活性	1:8	1:16	1:16

[0073] 总之,口服施用 0.1% Aquanin Plus 50 天增加了凡纳滨对虾的生长、存活和免疫应答。

[0074] 实验 2

[0075] 从泰国尖竹汶府商业虾农场获得凡纳滨对虾 (11-12 克)。运输总共 1,500 只农场饲养的虾并在玻璃纤维储水池中顺应。顺应 14 天后,将虾用于实验。在顺应期和实验期间盐度维持在 25ppt。

[0076] 为确定在饮食中施用 Aquanin Plus 的生长促进效应和存活效应,在三种处理中进行试验,处理由 0.05% 的 Aquanin Plus,0.1% 的 Aquanin Plus 和对照饲料 (六次重复 / 处理) 组成。每次重复由在 500 升储水池中 25 只虾 (11-12 克) 组成。虾每天以 3% 体重的含有梯度水平的 Aquanin Plus (0%、0.05% 和 0.1% 的饲料) 的压片饲料进行一天四次喂食,喂食 60 天。在 60 天的实验期间喂食速率根据虾的重量进行调整。水质参数如 pH、溶解氧 (DO)、氨、亚硝酸盐在实验期间每周进行测量。所有处理组的生长率和存活率每 20 天进行一次记录,记录 60 天。

[0077] 来自实验 2 (60 只虾 / 处理) 的虾用白斑综合征病毒 (WSSV) 通过单独喂食 12% 体重 WSSV 感染的虾进行激发。死亡的虾的数量记录 7 天。

[0078] 来自实验 2 (60 只虾 / 处理) 的虾也用黄头病毒 (YHV) 通过喂食一次 12% 体重 YHV 感染的虾进行激发。死亡的虾的数量记录 7 天。

[0079] 对数据进行单因素方差分析,之后进行 Duncan' s 多范围检验。如果 $P < 0.05$ 则认为差异显著。

[0080] 结果—确定 Aquanin Plus 对白虾的生长和存活的效应

[0081] 在施用饮食 40 天后,用 0.1% 的 Aquanin Plus 喂食的虾所具有的平均体重显著高于 ($P < 0.05$) 用 0.05% Aquanin Plus 和对照喂食的虾的平均体重 (表 3)。就存活百分数而言,在 Aquanin Plus 处理的虾之间无显著差异,但是 Aquanin Plus 处理虾的存活百分数显著高于 ($P < 0.05$) 对照组处理虾的存活百分数 (表 4)。

[0082]

表 3. 用 0、0.05%和 0.1% Aquanin Plus 喂食 60 天后, 凡纳滨对虾的平均体重。

喂食期 (天)	平均体重(克)		
	对照	0.05% Aquanin Plus	0.1% Aquanin Plus
0	11.76 ± 0.42a	11.78 ± 0.46a	11.86 ± 0.48a
20	12.28 ± 0.62a	12.73 ± 0.78ab	12.97 ± 0.78b
40	15.40 ± 1.19a	15.84 ± 0.99a	16.76 ± 1.33b
60	18.04 ± 1.93a	17.48 ± 1.89a	19.52 ± 2.26b

[0083] 在相同行中用不同字母表示的平均值是统计学上显著差异的 ($P < 0.05$)。

[0084]

表 4. 用 0、0.05%和 0.1% Aquanin Plus 喂食 60 天后, 凡纳滨对虾的存活百分数。

喂食期 (天)	存活百分数(%)		
	对照	0.05% Aquanin plus	0.1% Aquanin plus
0	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a
20	93.60 ± 1.35a	98.68 ± 0.37b	99.20 ± 0.31b
40	83.20 ± 0.11a	97.18 ± 1.66b	97.60 ± 0.15b
60	74.40 ± 6.07a	88.00 ± 6.32b	95.23 ± 1.79b

[0085] 在相同行中用不同字母表示的平均值是统计学上显著差异的 ($P < 0.05$)。

[0086] 实验 3

[0087] 从泰国尖竹汶府商业虾农场获得凡纳滨对虾 (11-12 克)。运输总共 1,500 只农场饲养的虾并在玻璃纤维储水池中顺应。顺应 14 天后, 将虾用于实验。在顺应期和实验期间盐度维持在 25ppt。

[0088] 在实验中使用由 0.05% 的 Aquanin Plus、0.1% 的 Aquanin Plus 和对照饲料组成的三种处理。每种处理 (六次重复 / 处理) 使用总共 150 只虾。总血细胞、吞噬百分数、酚氧化酶和杀菌活性的免疫参数每 10 天进行一次测量, 测量 50 天。

[0089] 免疫参数

[0090] 血淋巴样品的准备

[0091] 来自每只虾的 0.5 毫升的血样品从第三个步行足的基部通过含有 1.5 毫升抗凝剂 (K-199+5% L-半胱氨酸) 的注射器进行抽取。

[0092] 1. 总血细胞

[0093] 收集血淋巴后, 血细胞通过使用血细胞计数器计数, 计算为血细胞数目 (每立方毫米的总血细胞)。

[0094] 2. 吞噬

[0095] 这一方法改良自 Itami 等人 (Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan), 在 Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore 26-30 October 1992 中, The Asian Fisheries Society Manila, Phillipines. 1994)。

[0096] 从第三个步行足的基部收集两百微升血淋巴并与 800 皮升的无菌抗凝剂混合。收集的虾血细胞用虾盐水冲洗, 有活力细胞数量调整为 1×10^6 细胞 / 毫升。细胞悬液 (200 微升) 接种入盖玻片中。20 分钟后, 去除细胞悬液, 并用虾盐水冲洗三次。加入热灭活酵母 (2) 并孵育 2 小时。孵育后, 去除热灭活酵母, 用虾盐水冲洗五次, 并用 100% 甲醇固定。然后, 这一盖玻片用吉姆萨染液进行染色并用封片剂 (permount) 进行封片。

[0097] 计数两百个血细胞。吞噬活性, 定义为吞噬百分数, 表达为:

[0098] 吞噬百分数 = 吞噬血细胞 / 总血细胞 $\times 100$

[0099] 3. 酚氧化酶活性测定

[0100] 方法改良自 Supamattaya 等人 (The effect of β -glucan (Macrogard $\text{\textcircled{R}}$) on growth performance, immune response and disease resistance in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricus. Songklanakarin J. Sci. Technol. 22 : 677-688. 2000)。抽取血液后, 血细胞用虾盐水 (1,000rpm 4°C 10 分钟) 洗三次。血细胞裂解液 (HLS) 制备如下: 在 pH 7.4 的二甲胍酸盐缓冲液中的血细胞中使用超声仪在 30 振幅 (amplitude) 处理 5 秒, 然后将混悬物在 10,000rpm 4°C 离心 20 分钟。收集上清液作为 HLS。然后在二甲胍酸盐缓冲液中 200 皮升 0.1% 胰蛋白酶混合到 200 毫升 HLS 中, 随之为 200 皮升 4 毫克 / 毫升的 L-二羟基苯丙氨酸 (L-DOPA) 作为底物。酶活性测量为 490 纳米波长处多巴色素的吸光度。在 HLS 中蛋白含量的测量通过 Lowry 等人 (Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275. 1951) 的方法进行。酚氧化酶活性计算为每分钟每毫克蛋白质光密度 (optimum density, OD) 的增加, 如下:

[0101] 1 单位的酚氧化酶 = $\Delta OD_{490} / \text{分钟} / \text{毫克蛋白质}$

[0102] 4. 杀菌活性

[0103] 从每只虾样品的血液中分离血清, 并用 2.6% 氯化钠以 1 : 2、1 : 4、1 : 8、1 : 16 和 1 : 32 稀释。然后本研究中使用 0.5 毫升每种血清稀释物和作为对照的 0.5 毫升氯化钠。将 0.5 毫升哈氏弧菌 (*V. harveyi*) 混悬物 (根据 3 中的方法制备) 放入每种血清稀释物和对照中。通过扩散板技术计数细菌的数目之前, 处理在室温孵育 3 小时。记录来自稀释物的结果, 该结果与对照相比能够降低 50% 的哈氏弧菌。

[0104] 对数据进行单因素方差分析, 之后进行 Duncan' s 多范围检验。如果 $P < 0.05$ 则认为差异显著。

[0105] 结果—确定 Aquanin Plus 对白虾免疫特征的效应

[0106] 通过总血细胞计数 (THC)、吞噬百分数、酚氧化酶活性和杀菌活性来测量免疫应答。在实验期间, 水质参数维持如下: 温度在 $28 \pm 10^\circ\text{C}$, pH 在 7.8-8.0 和盐度在 25ppt。

[0107] 总血细胞计数

[0108] 喂食 20 天后, 用含有 0.1% Aquanin plus 饮食喂食的虾具有 $1.39 \pm 0.076 \times 10^7$

细胞 / 毫升的总血细胞计数, 该计数显著高于 ($P < 0.05$) 用含有 0.05% Aquanin plus 和对照的饮食喂食虾的总血细胞计数, 后两者具有的总血细胞计数分别为 8.5 ± 0.41 和 8.9 ± 0.23 细胞 / 毫升。然而, 喂食 30-50 天后, 两个用 Aquanin plus 处理的组具有的总血细胞计数显著高于 ($P < 0.05$) 对照组的总血细胞计数 (表 5)。

[0109]

表 5. 用 0、0.05% 和 0.1% 的 Aquanin plus 喂食 0、10、20、30、40 和 50 天后的凡纳滨对虾的总血细胞计数(THC)。

THC($\times 10^6$ 细胞/毫升)	对照	Aquanin plus	
		0.05%	0.1%
0 天	$7.05 \pm 0.67a$	$7.33 \pm 0.59 a$	$7.65 \pm 0.16a$
10 天	$8.28 \pm 3.43a$	$8.30 \pm 0.86 a$	$13.50 \pm 5.06a$
20 天	$8.50 \pm 0.41 a$	$8.90 \pm 0.23 a$	$13.90 \pm 0.76b$
30 天	$11.00 \pm 0.48a$	$12.20 \pm 0.44b$	$14.95 \pm 0.52c$
40 天	$11.00 \pm 0.53a$	$12.70 \pm 0.53b$	$15.65 \pm 0.99c$
50 天	$11.25 \pm 0.51a$	$13.38 \pm 0.29b$	$15.98 \pm 0.29c$

[0110] 在相同行中用不同字母表示的平均值是统计学上显著差异的 ($P < 0.05$)。

[0111] 吞噬活性

[0112] 喂食 20 天后, 用含有 0.1% Aquanin plus 饮食喂食的虾的吞噬百分数显著高于 ($P < 0.05$) 用含有 0.05% Aquanin plus 和对照组饮食喂食的虾的吞噬百分数, 它们的吞噬百分数分别为 24.72 ± 0.62 , 23.79 ± 0.36 和 22.11 ± 0.74 (表 6)。

[0113]

表 6. 用 0、0.05% 和 0.1% 的 Aquanin plus 喂食 0、10、20、30、40 和 50 天后凡纳滨对虾的吞噬百分数。

吞噬百分数	对照	Aquanin plus	
		0.05%	0.1%
0 天	$22.62 \pm 0.69a$	$21.74 \pm 2.50a$	$19.88 \pm 1.67a$
10 天	$22.42 \pm 1.75a$	$23.68 \pm 0.89a$	$23.17 \pm 1.18a$
20 天	$22.11 \pm 0.74a$	$23.79 \pm 0.36ab$	$24.72 \pm 0.62b$
30 天	$22.39 \pm 0.57 a$	$24.24 \pm 0.41 b$	$26.31 \pm 0.45c$
40 天	$23.51 \pm 1.20a$	$25.73 \pm 0.95ab$	$30.73 \pm 2.19b$
50 天	$25.75 \pm 1.34 a$	$27.86 \pm 1.64 a$	$33.61 \pm 0.85b$

[0114] 在相同行中用不同字母表示的平均值是统计学上显著差异的 ($P < 0.05$)。

[0115] 酚氧化酶活性

[0116] 喂食 10 天后,用含有 0.1% Aquanin plus 饮食喂食的虾具有 342.82 ± 109.17 单位/分钟/毫克蛋白质的酚氧化酶活性,该活性显著高于 ($P < 0.05$) 用含有 0.05% Aquanin plus 和对照饮食喂食虾的酚氧化酶活性,后两者的酚氧化酶活性分别为 315.11 ± 19.90 和 279.27 ± 81.25 单位/分钟/毫克蛋白(表 7)。

[0117]

表 7. 用 0、0.05%和 0.1%的 Aquanin plus 喂食 0、10、20、30、40 和 50 天后凡纳滨对虾的酚氧化酶活性。

酚氧化酶活性 (单位/分钟/毫克 蛋白)	对照	Aquanin plus	
		0.05%	0.1%
0 天	$255.84 \pm 20.53a$	$246.80 \pm 17.20a$	$251.74 \pm 26.18a$
10 天	$279.27 \pm 81.25a$	$315.11 \pm 19.90a$	$342.82 \pm 109.17b$
20 天	$282.03 \pm 26.91 a$	$318.73 \pm 14.61 a$	$406.67 \pm 26.53b$
30 天	$290.95 \pm 28.83a$	$301.42 \pm 14.41 ab$	$426.37 \pm 43.18b$
40 天	$303.85 \pm 25.37 a$	$377.93 \pm 39.86ab$	$471.47 \pm 46.82b$
50 天	$307.08 \pm 18.92 a$	$326.65 \pm 19.98a$	$441.98 \pm 32.63b$

[0118] 在相同行中用不同字母表示的平均值是统计学上显著差异的 ($P < 0.05$)。

[0119] 杀菌活性

[0120] 在实验 10 天后,用 0.05%和 0.1% Aquanin plus 喂食的虾在 1 : 16 的血清稀释中具有杀菌活性,而对照在 1 : 8 的血清稀释中具有杀菌活性(表 8)。

[0121]

表 8. 用 0、0.05%和 0.1%的 Aquanin plus 喂食 0、10、20、30、40 和 50 天后凡纳滨对虾的杀菌活性。

杀菌活性	对照	Aquanin plus	
		0.05%	0.1%
0 天	1:8	1:8	1:8
10 天	1:8	1:16	1:16
20 天	1:8	1:16	1:16
30 天	1:8	1:16	1:16
40 天	1:8	1:16	1:16
50 天	1:8	1:16	1:16

[0122] 实验 4

[0123] 从泰国尖竹汶府商业虾农场获得凡纳滨对虾 (11-12 克)。运输总共 1,500 只农场饲养的虾并在泰国农业大学水产学院的水产养殖业研究组实验室 (Aquaculture Business Research Unit laboratory, Faculty of Fisheries, Kasetsart University) 的玻璃纤维储水池中顺应。顺应 14 天后,将虾用于实验。在顺应期和实验期间盐度维持在 25ppt。

[0124] 喂食 60 天后,来自实验 1 (60 只虾 / 处理) 的虾用哈氏弧菌的有毒菌株进行激发,该哈氏弧菌的有毒菌株已在胰蛋白酶大豆琼脂 (TSA) 加 1.5%氯化钠 (w/v) 中培养。所有的虾用 0.1 毫升哈氏弧菌混悬液以 2×10^5 菌落形成单位 / 毫升 (48 小时 LD50) 进行肌肉注射。将来自所有处理组虾的累积死亡率记录 7 天。

[0125] 对数据进行单因素方差分析,之后进行 Duncan' s 多范围检验。如果 $P < 0.05$ 则认为差异显著。

[0126] 结果—通过哈氏弧菌和白斑综合征病毒 (WSSV) 感染后 Aquanin plus 对白虾存活
的效应

[0127] 用 2×10^5 菌落形成单位 / 毫升的哈氏弧菌肌肉注射至不同水平 Aquanin plus (0、0.05 和 0.1%) 喂食的虾 7 天以后,两个 Aquanin plus 组中虾的 100% 存活,而在对照组中虾的存活率是 56.67% (表 9)。

[0128]

表 9. 用 0、0.05%和 0.1% Aquanin plus 喂食 60 天后并被哈氏弧菌感染的凡纳滨对虾的死亡百分数。

天	%死亡率		
	对照	0.05%Aquanin plus	0.1%Aquanin plus
0	0.00	0.00	0.00
1	13.33	0.00	0.00
2	43.33	0.00	0.00
3	43.33	0.00	0.00

[0129]

4	43.33	0.00	0.00
5	43.33	0.00	0.00
6	43.33	0.00	0.00
7	43.33	0.00	0.00

[0130] 来自所有 Aquanin plus 喂食 WSSV 感染虾的死亡率显示于表 10 中。在对照组中，6 天内的死亡率是 100%，而对于两个 Aquanin plus 组，在第 7 天观察到 100%死亡率。

[0131]

表 10. 用 0、0.05%和 0.1%Aquanin plus 喂食 60 天后并被白斑综合征病毒感染的凡纳滨对虾的死亡百分数。

天	%死亡率		
	对照	0.05%Aquanin plus	0.1%Aquanin plus
0	0.00	0.00	0.00
1	10.00	0.00	0.00
2	40.00	6.67	0.00
3	50.00	23.33	0.00
4	63.33	46.67	33.33
5	80.00	60.00	46.67
6	100.00	96.67	80.00
7	100.00	100.00	100.00

[0132] 用黄头病毒激发 3 种浓度 (0、0.05 和 0.1%) 的 Aquanin plus 喂食 60 天的虾, 在对照组中于第 6 天观察到 100% 死亡率, 在对照组中的所有虾在 6 天内死亡。相比之下, 在 Aquanin plus 组中于第 7 天观察到死亡率 (表 11)。

[0133]

表 11. 用 0、0.05% 和 0.1% Aquanin plus 喂食 60 天后并被黄头病毒感染的凡纳滨对虾的死亡百分数。

天	%死亡率		
	对照	0.05% Aquanin plus	0.1% Aquanin plus
0	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00
3	45.00	15.00	0.00
4	75.00	45.00	25.00
5	95.00	70.00	55.00
6	0.00	0.00	80.00
7	0.00	0.00	0.00

[0134] 上述的实验 2-4 证明 0.1% 的 Aquanin plus 饮食对凡纳滨对虾具有生长促进效应, 这通过测量体重增加进行评估。这种生长促进效应可能是由于 β -环糊精半胱胺盐酸化物, 其在 Aquanin plus 中以大约 27% 存在。已知半胱胺可引起哺乳动物和小鸡中生长激素 (GH) 释放和生长速率的直接或间接增加 (Hall 等人, Control of growth hormone secretion in the vertebrates: a comparative survey. Comp. Biochem. Physiol. 84: 231-253. 1986), 但是对于有壳的水生动物尚待分析。在草鱼 (三草鱼 (*C. idellus*)) 中, 半胱胺盐酸化物在密集大规模水产养殖中用于促进所培养鱼的生长 (Xia 和 Lin, Cysteamine—a somatostatin-inhibiting agent-induced growth hormone secretion and growth acceleration in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Gen. Comp. Endocrinol. 134: 285-295. 2003)。半胱胺和半胱胺盐酸化物具有很多的优势, 如缺乏物种特异性、简单的化学组成、对所养殖鱼药物的方便饮食施用和低成本 (Xia 和 Lin, 2003)。

[0135] 鉴于 Aquanin plus 对免疫特征的效果, 这些实验结果表明应用 0.1% 的 Aquanin plus 在 20 天中可有效地增强凡纳滨对虾的总血细胞和吞噬百分数, 并在 10 天后增强酚氧化酶活性和杀菌活性。而且, 使用 0.05% 的 Aquanin plus 可增加总血细胞和杀菌活性。不受任何理论的约束, 似乎 Aquanin plus 的半胱胺和维生素 E (其可以增强细胞和体液免疫应答) 可能在增强凡纳滨对虾培养物的免疫刺激能力中发挥重要作用。总之, 这些实验结果表明, 在凡纳滨对虾饮食方面, 0.1% 的 Aquanin plus 在喂食 40 天后有效地增强生长、存

活率和免疫应答（包括 THC、吞噬百分数和酚氧化酶活性和杀菌活性）。

[0136] 本文中所提到或引用的所有专利、专利申请和出版物完整引入本文作为参考，包括所有的图和表，所引用的范围是其与本说明书的教导并不矛盾。

[0137] 应当理解本文中所描述的例子和实施方案仅仅是为了示例性说明的目的，本领域技术人员将获得在此之上多种修饰和改变的启示，它们包含于本申请的精神和范围内。

分钟/毫克蛋白

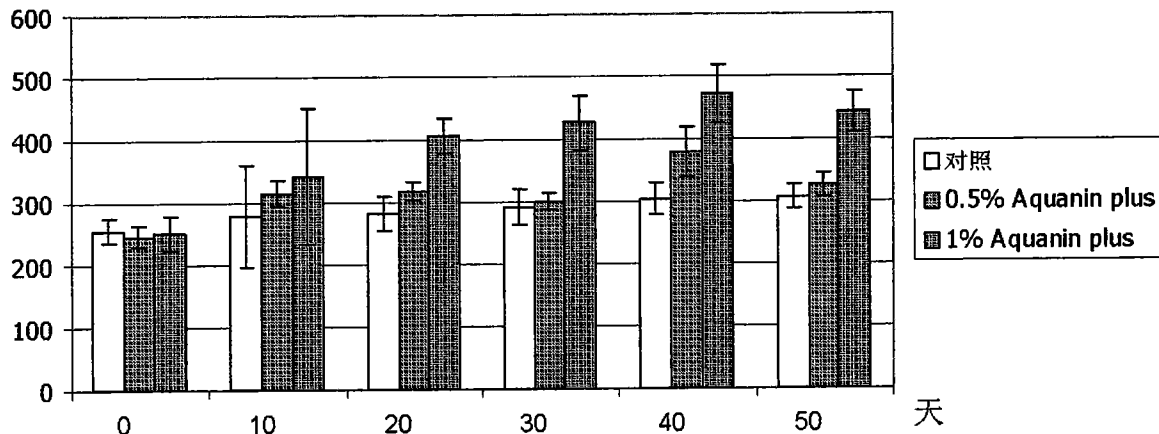


图 1

$\times 10^6$ 细胞/毫升

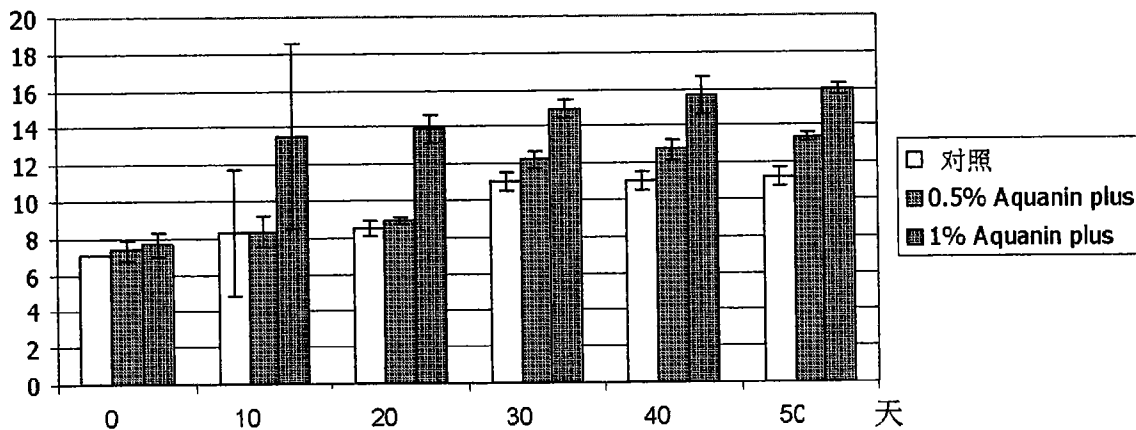


图 2

百分率

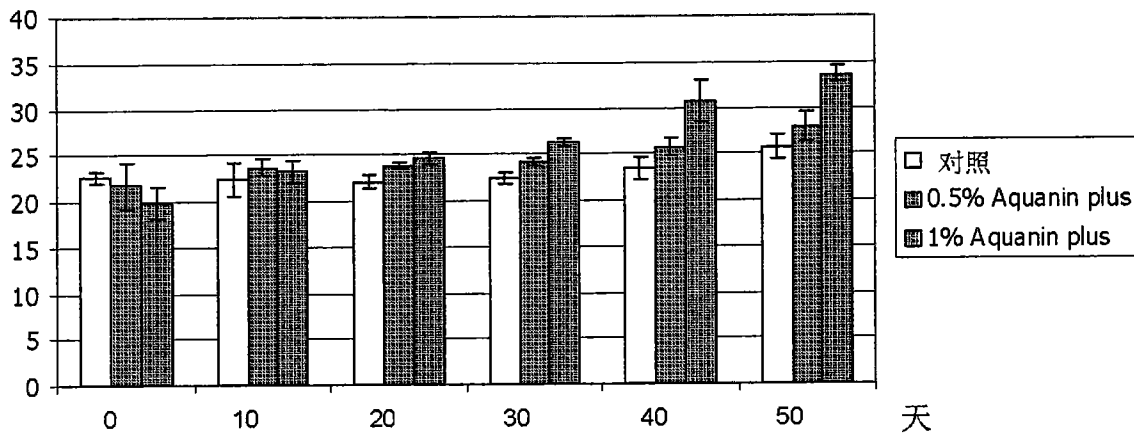


图 3

血清浓度

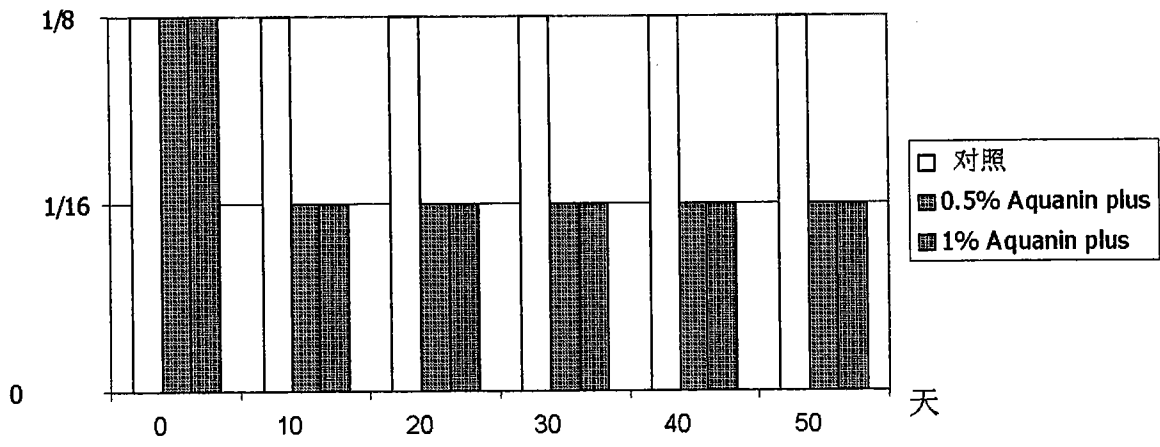


图 4

% 存活率

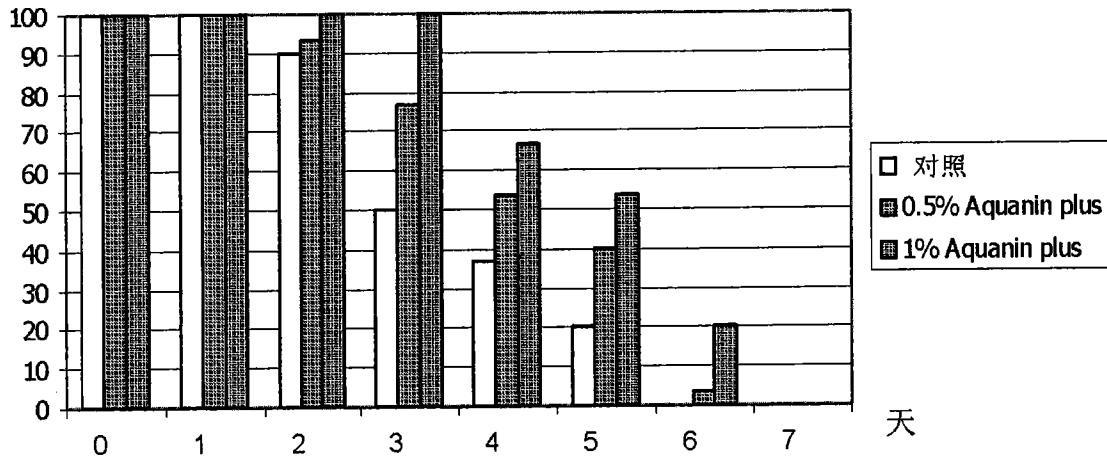


图 5

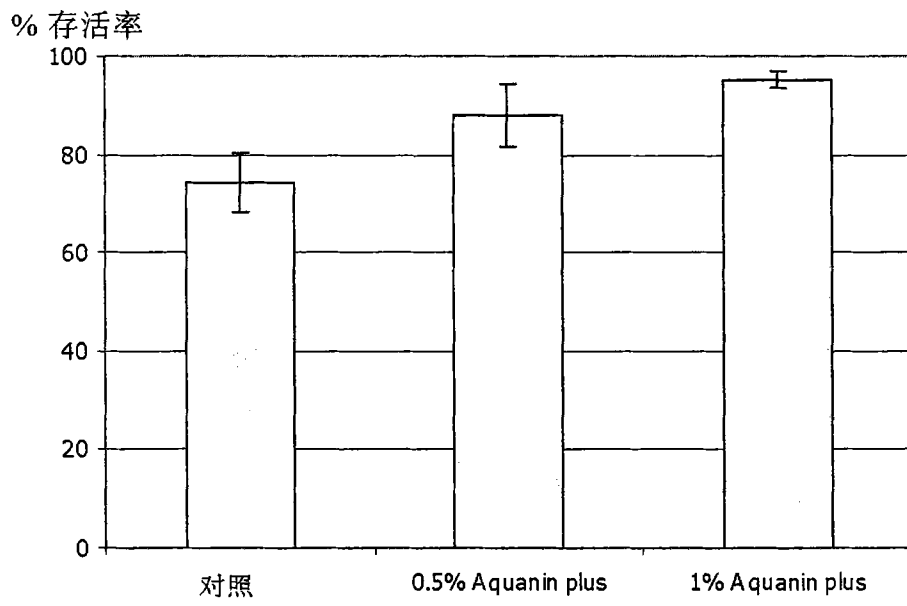


图 6

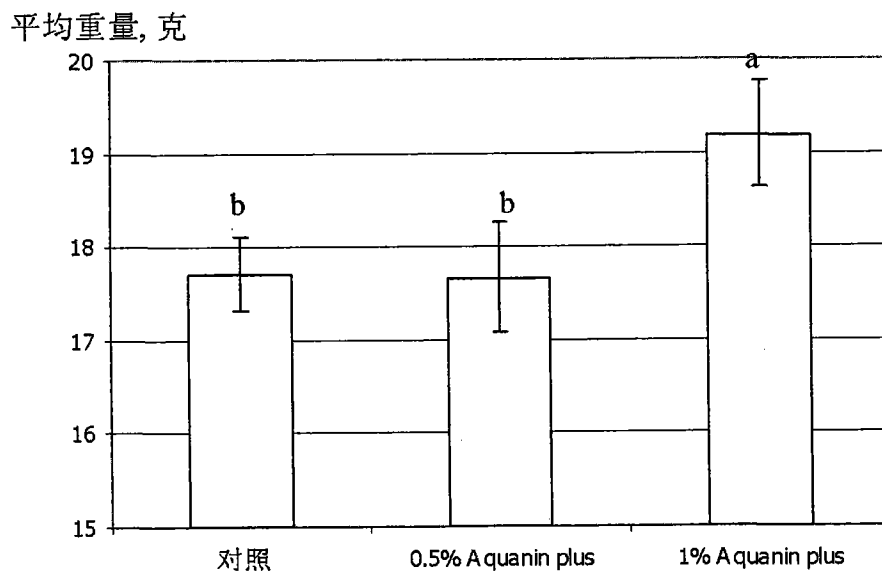


图 7