

誘引劑經由活化神經胜肽 F 基因表現以促進白蝦食慾及生長

宋嘉軒¹ · 陳亭宇² · 陸振岡^{2*}

¹行政院農業委員會水產試驗所企劃資訊組

²國立臺灣海洋大學水產養殖學系

摘要

神經胜肽F (neuropeptide F, NPF) 是類似脊椎動物神經胜肽Y (neuropeptide Y) 的一種胜肽，主要調控無脊椎動物的攝食、代謝、繁殖和對於外來刺激的反應。攝食調控基因廣泛分佈於中樞和週邊神經系統，藉由兩者之間的相互調控而影響食慾與攝食行為。本實驗在研究攝食因子 - NPF基因之表現對白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 攝食之影響，以及 NPF 在白蝦各組織中的表現量，經由 RT-PCR 分析結果顯示，NPF 基因表現在神經節和腦組織中較高。在固定攝食週期下，白蝦神經節 NPF 基因之表現，在攝食前 1 hr，NPF 基因的表現出現顯著上升，攝食後，NPF基因表現量逐漸降低。此外，大蒜萃取物、硫代甜菜鹼 (DMPT) 及氧化三甲胺 (TMAO) 三種誘引劑皆能顯著促進白蝦中 NPF 基因的表現量。且混合使用 DMPT 及 TMAO 則具有加乘作用。攝食前處理 TMAO 則可使白蝦 NPF 基因表現量顯著上升 ($p < 0.05$)，可縮短找尋飼料的時間、增加其攝食量。本研究證實誘引劑藉由影響攝食調控基因NPF表現增進食慾與攝食，並確定 NPF 與甲殼類攝食及其行為有關，是白蝦重要的促攝食調控因子。

關鍵詞：攝食調控、神經胜肽 F、攝食行為、誘引劑

前言

在一般情況，動物飢餓時就會想要攝食 (food intake)，因此會有攝食行為 (feeding behavior) 的產生，當攝取到足夠的食物而有飽足感 (satiety) 時，就會停止攝食，而攝食行為就會停止，若無法攝取足夠的食物，攝食行為則會持續的出現；所以當出現攝食行為，代表動物是飢餓的，有食慾產生想要攝食，反之當攝食行為停止，代表動物是飽足的，沒有攝食的食慾 (宋, 2005)。

甲殼類的攝食行為一般可分成五個連續的動作：1. 感受食物的存在 (perception)，一般是透過嗅覺的產生，感受到食物的氣味；2. 辨別食物來源的方向 (orientation)；3. 開始尋朝向食物的方向移動 (movement)；4. 抵達食物位置 (arrival)；5. 最後將食物攝入口中 (ingestion)，完成攝食行為 (Mendoza *et*

al., 1997)。攝食目的是透過食物的攝入，由體內本身的生理和生化的作用消化食物轉換成營養及能量。蝦類的主要嗅覺器官，位於頭胸甲上的兩對觸角，分為第一觸角和第二觸角，其具嗅覺、觸覺和平衡等化學感覺受器，可感受外界的食物位置 (Reidenbach and Koehl, 2011)，甲殼類進食過程中使用鉗或顎足來掠取食物，蝦類利用棘齒來移動食物，送入前口腔 (顎足) 以後，用口部來磨碎且分類可食或不可食之物 (沈等, 2010)。

攝食行為除受食物的顆粒大小、形狀、光澤、顏色和硬度等物理刺激而引起感應外，還會受到食物中溶出物成分的化學刺激而引起 (宋, 2005)。除少部分的魚類僅經由視覺進行索餌外，大多數的甲殼類及魚類的索餌主要是經由嗅覺和味覺來進行。甲殼類的嗅覺受器能接受水體中低濃度化學物質的刺激，有感受氣味的能力，能區別化學物質且極靈敏，其觸角上的觸毛能增加其與外界水環境的接觸面積 (Reidenbach and Koehl, 2011)，提高了嗅覺的靈敏度。

*通訊作者 / 基隆市北寧路 2 號；TEL: (02)2462-2192；
FAX: (02)2463-1663；E-mail: f0008@mail.ntou.edu.tw

魚類的負責調控攝食的腦區，主要位於大腦中的下視丘 (Peter and Crim, 1979; Demski and Northcutt, 1983)，在下視丘的弓狀核 (arcuate nucleus, ARC) 中有兩組神經元，分別是負責調控促進攝食、增加食慾的 NPY/AgRP (neuropeptide Y / Agouti-related peptide) 神經元和抑制攝食、降低食慾的 POMC/CART (pro-opiomelanocortin / cocaine- and amphetamine-regulated transcript) 神經元 (Volkoff *et al.*, 2005)，其中 NPY/AgRP 神經元釋放出的 NPY 可以刺激大腦產生食慾，為最主要的促進攝食因子 (Narnaware *et al.*, 2000)。Narnaware and Peter (2001) 在金魚的研究中發現，透過飢餓誘發，會增加中樞神經系統 NPY 的基因表現量；另，利用注射適當的 NPY，可使金魚產生攝食及促進攝食行為 (Narnaware *et al.*, 2000)。在無脊椎動物中雖沒有發現 NPY 的存在，但在神經系統中有另一種神經胜肽 F (neuropeptide phenylalaninamide, neuropeptide F, NPF) 也具有相同促進攝食的作用 (Lee *et al.*, 2004; Christie *et al.*, 2011; Nässel and Wegener, 2011)。

神經胜肽 F 是由 39 個胺基酸所組成的神經胜肽，命名的由來是由於在胜肽鏈羧基端 (carboxyl-terminal) 的胺基酸都是苯丙胺酸 (phenylalaninamide) 結尾，故命名為 neuropeptide phenylalaninamide，而 phenylalaninamide 的單字簡寫為 F，故又稱作 neuropeptide F，簡稱為 NPF (Stanek and Brown, 2002)。NPF 主要被發現於無脊椎動物，包括扁形動物 (Dogan *et al.*, 2002; Humphries *et al.*, 2004)、軟體動物 (Rajapara *et al.*, 1992)、環節動物 (Roller *et al.*, 2008) 和節肢動物 (Brown *et al.*, 1999; Stanek *et al.*, 2002; Nuss *et al.*, 2010) 等，與主要發現與脊椎動物的 NPY 功能類似，在攝食、代謝、繁殖和外來刺激的反應皆有影響 (Nässel and Wegener, 2011)。如昆蟲的 NPF 可以促進攝食 (Gonzalez and Orchard, 2009; Krashes *et al.*, 2009)；果蠅的 NPF 具有覓食、攝食、酒精的敏感性、受到外來刺激之功能 (Wu *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006)，扁蟲的 NPF 與攝食及繁殖之功能有關 (Collins *et al.*, 2010)，椎實螺的 NPF 則有能量平衡和成長的功能 (Nässel and Wegener, 2011)。透過外源性的添加 NPF 蛋白在水體及飼料中，可以促使白蝦之攝食及促進其成

長 (Christie *et al.*, 2011)。

自然界中廣佈著許多可引誘甲殼類產生攝食行為的物質，而甲殼類只會對特定喜歡的食物味道有反應，並藉由嗅覺、味覺和觸覺三者之間的配合，決定是否攝食。由於甲殼類的視覺較差，因此大部分的甲殼類攝食透過嗅覺和味覺來進行，在接觸到食物之前，嗅覺則可能扮演更主要的角色。誘引劑 (attractant) 是屬於非營養性添加劑，在飼料中添加不僅可以促進水產生物的攝食、改善飼料的適口性、縮短攝食時間、提高攝食量，而攝食量的提高間接促進了生長，同時也能促進水產動物對飼料中營養素的消化吸收，進而提高飼料轉換率，減輕水質污染和降低成本等重要作用。在水產動物中，甜菜鹼 (betaine)、硫代甜菜鹼 (Dimethyl- β -propiothetin, DMPT) (Nakajima, 1992)、氧化三甲胺 (trimethylamine N-oxide, TMAO) (李, 2006)、胺基酸、核酸 (王與韓, 1994) 及動植物萃取液 (賈, 1997) 等均有被使用做為誘引劑。

本研究希望了解白蝦 NPF 基因表現模式與攝食週期之關係，進一步探討誘引劑是如何影響養殖生物體內 NPF 的基因表現，達到其促進食慾、增加攝食量及成長的效果。

材料與方法

一、實驗動物

白蝦購自於國立臺灣海洋大學水生動物實驗中心，其白蝦規格有平均體長為 9 cm，平均重約為 7 g 之成蝦進行誘引實驗，以及白蝦體長約 1 cm 分，平均濕重約為 73 mg 之幼蝦進行成長實驗。使用台榮產業股份有限公司所販售之草蝦中蝦 2、3 號飼料進行投餵。

二、Total RNA 萃取

取白蝦之腦、心臟、肝胰臟、神經節、腸、眼柄神經節、血淋巴、肌肉組織，先以 RNase-free 水清洗，加入 10 倍體積之 TRIzol[®] reagent (Invitrogen, USA)，用剪刀先將組織剪碎再用均質棒打碎，加入 1/5 體積的氯仿 (chloroform)，強力搖晃 30 sec，置於室溫下靜置 10 min，在 4°C

下 $16,000 \times g$ 離心 15 min。吸取上清液至新的微量離心管中，加入 2 倍體積的 isopropanol，經均勻混合後，於室溫下靜置 10 min，隨後在 4°C 下 $16,000 \times g$ 離心 5 min 沈澱 RNA。將 RNA 溶解在 20 μl RNase-free 水中。置於 55°C 下溶解 10 min，然後儲存在 -80°C 冰箱中備用。測量 RNA 濃度與純度比值。

三、反轉錄 (reverse transcription, RT)

取 5 μg 之 total RNA 於 200 μl 微量離心管中並以 RNase-free 水將總體積調整至 13 μl ，加入 1 μl 之 oligo (dT)₁₈、10 mM dNTPs，置於冰上。再加入 $5 \times$ AMV buffer 4 μl 及 AMV reverse transcriptase (Invitrogen, USA) 1 μl (40 units/ μl)，均勻混合，於 42°C 反應 60 min 以合成 cDNA，再以 70°C 作用 10 min 以終止反應。

四、聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

將 RT 做好的 cDNA 模板 (template)，以 Taq polymerase 進行 PCR 擴增分析。取 1 μl cDNA 加入 0.5 μl 的 10 mM dNTPs、2.5 μl 的 $10 \times$ PCR buffer、專一性引子 (gene specific primer, GSP) (beta-actin-F/R 5'-GCATCCACGAGACCACTTACA-3'/5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACATC-3'; NPF-GSP-F/R 5'-ATTTCGGCAAACGCAGCGACTA-3'/5'-GAGAGGGAAGGAAGGCGGACA-3') 各 0.5 μl 及 0.25 μl Taq polymerase 加入二次滅菌水將總體積調整至 25 μl 。將反應管置入 PCR 反應器 (DNA thermal cycler; Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) 中，設定以下條件反應： 94°C 解離 2 min； 94°C 解離 30 sec； 64°C 黏合 30 sec； 72°C 合成 1 min；解離、黏合、合成步驟重複 30 (NPF) /25 (beta-actin) 個循環後保存在 4°C 下。取反應後的 PCR 產物 5~15 μl ，以 1.5% 瓊脂膠體進行電泳分析，經溴化乙錠 (EtBr) 染色 10 min 後，以水退染約 10 min 置於照相系統 Digital Gel Image System 擷取影像，並以 UN-SCAN-IT gel - Gel Analysis Software Version 6.1 (Silk Scientific, USA) 定量，以 beta-actin 基因表現量做為 internal control 與

NPF 基因表現量進行相對表現量之計算分析。

五、實驗設計

(一) 固定攝食週期，白蝦各組織及神經節組織 NPF 基因之表現模式 (expression pattern)

實驗用白蝦經一周以上馴養，皆篩選體重介於 6~8 g 之間。以 2% 體重之飼料量進行投餵，於每天餵食兩次 (11:00~11:30 及 19:00~19:30)，每次投餵皆在 20 分鐘內結束，連續七天。第八天進行實驗，分別在 17:00、18:00、19:00、20:00 及 21:00 採樣，共五個採樣時間點，每一採樣時間點自 FRP 桶中隨機各取三隻白蝦。每隻蝦取腦、心臟、血淋巴、中腸、肝胰臟、眼柄、神經節及肌肉組織，並萃取該組織 Total RNA，進行半定量 (semi-quantitative) RT-PCR 分析。

(二) 大蒜萃取物 (garlic extract)、TMAO 及 DMPT 對於白蝦 NPF 基因表現之影響

在進行投餵前 30 min，以浸泡方式將大蒜萃取物、TMAO、DMPT (Sigma-Aldrich, USA) 濃度為 50 ppm 溶於水體中，控制組則是未添加誘引劑之組別，之後每隔 5 min 進行採樣，每個採樣點隨機採取 3 隻白蝦作為 3 重覆，共 7 個時間點。每隻白蝦取神經節組織，並萃取該組織 total RNA，進行半定量 RT-PCR 分析。

(三) 攝食期間 TMAO 對於白蝦第一反應時間與攝食量之影響

將白蝦分為未浸泡 TMAO 之控制組，及浸泡 TMAO (50 ppm) 之實驗組兩組，每組 3 隻白蝦，實驗進行 6 天。實驗組在每天投餵前 10 min 將 TMAO 加入水體，以打氣將其均勻混合於水中，而在 10 min 後進行投餵，將飼料投餵在固定缸壁位置，計時兩組白蝦撿拾飼料之第一反應時間及攝食量，投餵時間為 30 min。第一反應時間為當投餵飼料後，白蝦撿食到第一顆飼料所需的時間。

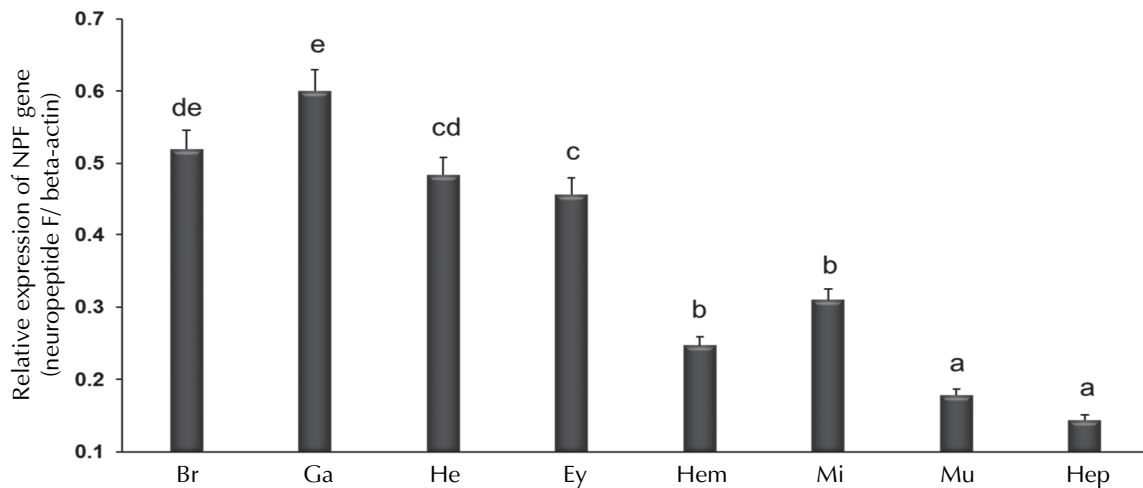


Fig. 1 The mRNA expression of neuropeptide F (NPF) at different tissues in white shrimp. Significant differences ($p < 0.05$) among different groups were compared using one-way ANOVA followed by Duncan multiple-comparisons test. Br: brain, Ga: ganglion, He: heart, Ey: eyestalk, Hem: hemolymph, Mi: midgut, Mu: muscle, Hep: hepatopancreas.

(四) 單一及混合使用兩種含氮、硫化物誘引劑 (TMAO、DMPT) 對於白蝦 NPF 基因表現之影響

實驗分為 DMPT、TMAO 以及兩者混合等三組 (DMPT/TMAO)，以浸泡方式溶於水體，濃度皆為 50 ppm，另以未加入誘引劑者作為控制組。在添加誘引劑 20 min 後進行採樣，每個組別各取 3 隻白蝦作為 3 重覆。每隻蝦取神經節組織，並萃取該組織 total RNA，進行半定量 RT-PCR 分析。

(五) 飼料中添加大蒜萃取物、TMAO 及 DMPT 對於白蝦成長之影響

以大蒜萃取物、TMAO 及 DMPT 分別添加於市售飼料，添加量為飼料重量的 0.2%，擠粒及於 65°C 烘乾後，置於 4°C 保存。白蝦成長試驗分別為未加誘引劑之控制組、市售飼料組、TMAO 組、DMPT 組、大蒜萃取物組。每組為 20 隻白蝦蝦苗，濕重約為 73 mg。每天投餵量約為蝦重量的 5%，每天投餵兩次，投餵時間分別為 11:00 及 19:00，每星期秤其濕重，記錄並計算增重率、每日平均增重及每日增重率。

$$\text{增重率 (percent weight gain, PWG) (\%)} \\ = \{[\text{終重(g)} - \text{初重(g)}] \div \text{初重(g)}\} \times 100\%$$

$$\text{平均增重 (average daily growth, ADG) (g)} \\ = [\text{終重(g)} - \text{初重(g)}] \div \text{總天數}$$

$$\text{每日增重率 (specific growth rate, SGR) (\%)} \\ = \{[\ln(\text{終重(g)}) - \ln(\text{初重(g)})] \div \text{總天數}\} \times 100\%$$

結 果

一、NPF 基因在不同組織間的表現形式

在實驗前隨機採取白蝦，分別取其腦、心臟、血淋巴、中腸、肝胰臟、眼柄、神經節及肌肉組織，抽取其 total RNA，以半定量反轉錄聚合酶連鎖反應偵測，分析 NPF 基因在各組織表現情形。分析結果顯示，NPF 基因會表現在腦、神經節、心臟、眼柄、血淋巴、中腸、肌肉、肝胰臟 (Fig. 1) 等組織，其中以神經節組織的表現量最高、腦組織次之最，而以肌肉、肝胰臟為最低。

二、固定攝食週期下，白蝦神經節組織之 NPF 基因表現

在固定時間點進行投餵，分別在攝食前 2 及 1 hr、攝食零時以及攝食後 1 和 2 hr 進行取樣，以半定量反轉錄-聚合酶連鎖反應分析 NPF 基因

Fig. 2 The mRNA expression of neuropeptide F (NPF) at regular meal time in white shrimp. Significant differences ($p < 0.05$) among different groups were compared using one-way ANOVA followed by Duncan multiple-comparisons test.

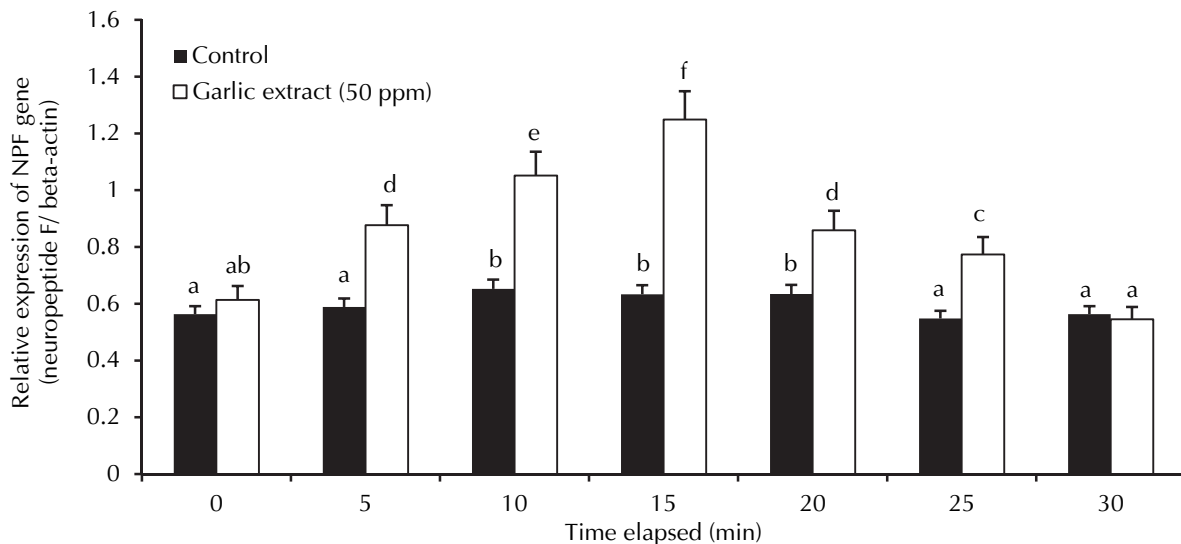
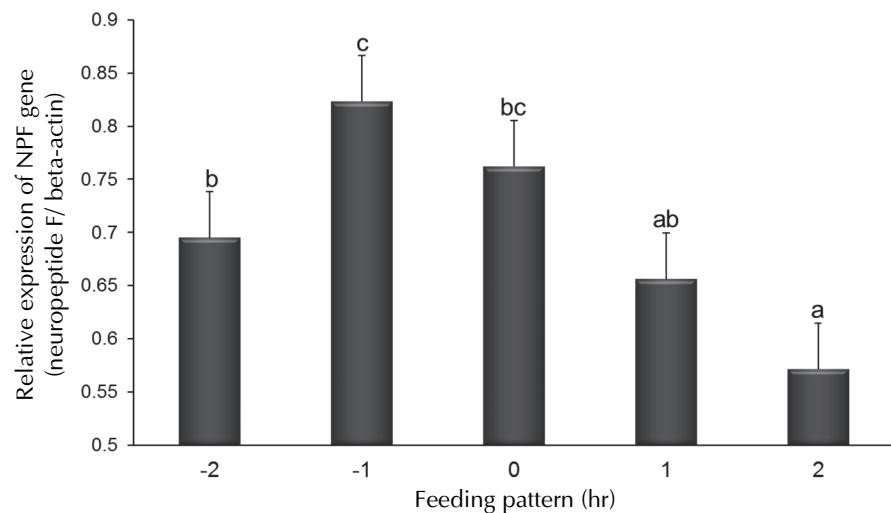


Fig. 3 The mRNA expression of neuropeptide F (NPF) in white shrimp were immersed with garlic extract. Significant differences ($p < 0.05$) among different elapsed times were compared using one-way ANOVA followed by Duncan multiple-comparisons test.

在白蝦神經節組織之表現模式。由實驗結果得知，白蝦攝食前之 NPF 基因的相對表現量 (relative expression) 會隨著攝食時間的到達而顯著上升，攝食前 1hr NPF 基因的相對表現量顯著 ($p < 0.05$) 高於攝食前 2 hr，但與攝食零時無統計差異 ($p > 0.05$)。攝食時的 NPF 基因的相對表現量快速下降，攝食後 1 hr 的相對表現量下滑至與攝食前 2 hr 者相似 (Fig. 2)。在攝食後 1~2 hr 間，NPF 基因的相對表現量緩慢下降，到攝食後 2 hr，NPF 基因的表現量下降至最低，顯著低於攝食零時者 ($p < 0.05$)。在所有時間點中，NPF 基因的相對表現量在攝食前 1 hr 最高，其次為攝食零時，攝食前 2 hr

與攝食後 1 hr 的相對表現量再次之，攝食後 2 hr，NPF 基因的相對表現量為所有時間點中最低。

三、大蒜萃取物、TMAO 及 DMPT 對於白蝦 NPF 基因表現之影響

實驗結果發現，在水體中添加大蒜萃取物、TMAO 及 DMPT 後，對促進白蝦 NPF 基因表現量有相同的趨勢，在處理後 30 min 內，第 10~15 min，NPF 基因表現量達到最高，在第 20 min 開始下降 (Figs. 3~5)。其中大蒜萃取物試驗組的 NPF 基因相對表現量在處理後第 15 min (Fig. 3) 達最

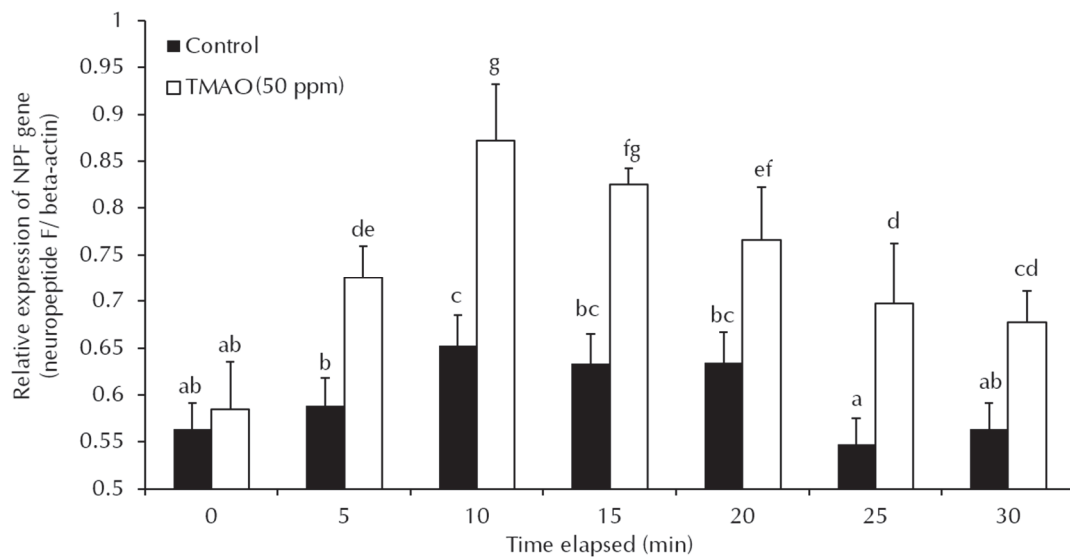


Fig. 4 The mRNA expression of neuropeptide F (NPF) in white shrimp were immersed with TMAO. Significant differences ($p < 0.05$) among different elapsed times were compared using one-way ANOVA followed by Duncan multiple-comparisons test.

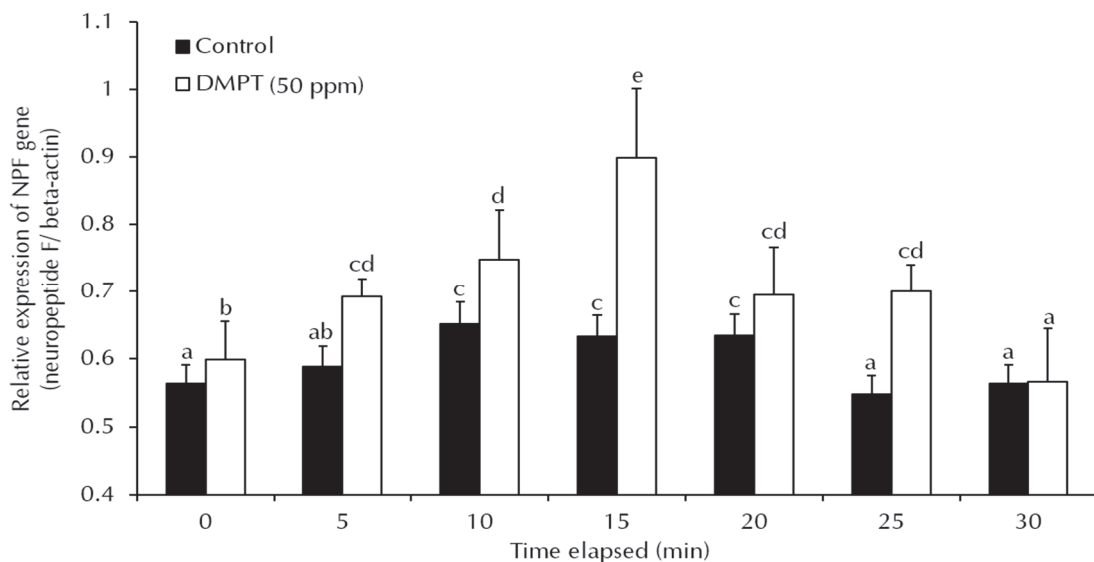


Fig. 5 The mRNA expression of neuropeptide F (NPF) in white shrimp were immersed with DMPT. Significant differences ($p < 0.05$) among different elapsed times were compared using one-way ANOVA followed by Duncan multiple-comparisons test.

高，TMAO 及 DMPT 試驗組的 NPF 基因相對表現量則分別在處理後第 10 min (Fig. 4) 及第 15 min (Fig. 5) 達高峰，在達高峰前與其他時間點均有顯著差異 ($p < 0.05$)。比較單一誘引劑與複方使用效果之差異，將實驗組分組，分別為 DMPT、TMAO 及兩者的混合組 (DMPT/TMAO)，以浸泡方式溶於水體，濃度皆為 50 ppm，三組實驗組之 NPF 基因相對表現量皆顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，試驗組中之 NPF 基因相對表現量以 DMPT/TMAO 的

複方使用的混合組為最高，顯著高於 DMPT 試驗組者 ($p < 0.05$)，DMPT 試驗組者又顯著高 TMAO 試驗組者 (Fig. 6)。

四、TMAO 對白蝦第一反應時間與攝食量之影響

實驗結果發現，在攝食前水體加入 TMAO 處理後，白蝦攝食到第一顆飼料所需反應時間為

13 sec，未處理之控制組為 37 sec (Table 1)。經過 TMAO 處理後，平均每隻白蝦在 30 min 內攝食量為 10.2 顆，未處理之控制組為 7.9 顆 (Table 2)。

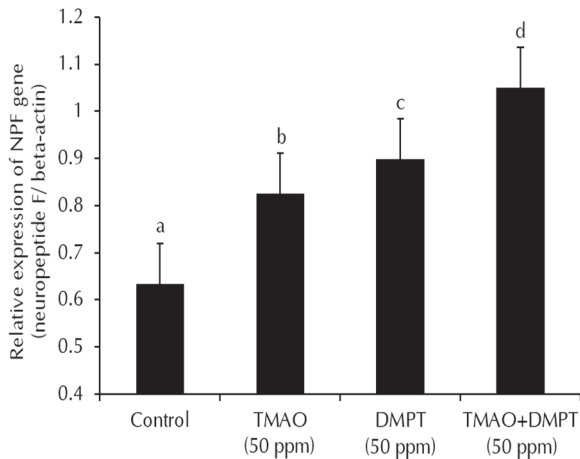


Fig. 6 The mRNA expression of neuropeptide F (NPF) in white shrimp were immersed with attractants. Significant differences ($p < 0.05$) among different groups were compared using one-way ANOVA followed by Duncan multiple-comparisons test

Table 1 The first response time in white shrimp were immersed with TMAO

	First response time (sec)	
	TMAO	Control
Elapsed time	13 ± 5	37 ± 14

Table 2 The food intake in white shrimp were immersed with TMAO

	Pellet uptake (pellets)	
	TMAO	Control
30 mins	10.2 ± 6.2	7.9 ± 5.2

五、飼料添加大蒜萃取物、TMAO 及 DMPT 對於白蝦成長之影響

經 49 天投餵實驗結果發現，各組之體重 (Fig. 7) 及體長 (Fig. 8)，與投餵未添加誘引劑飼料之控制組相比，投餵含誘引劑的飼料最高使體

重增加 65%，體長增加 32%。各項成長指標以投餵添加 TMAO 的飼料組為最佳 (增重率為 13.08%，每日平均增重 19.50 mg，每日增重率為 5.38%)，添加 DMPT 的飼料組次之 (增重率為 11.66%，每日平均增重 17.37 mg，每日增重率為 5.18%)，投餵添加大蒜精之飼料組 (增重率為 8.99%，每日平均增重 13.40 mg，每日增重率為 4.69%) 的成長指標與投餵市售商業飼料組 (增重率為 8.72%，每日平均增重 12.99 mg，每日增重率為 4.63%) 的結果相近，優於控制組 (增重率為 7.51%，每日平均增重 11.19 mg，每日增重率為 4.36%) 的相關成長指標。

討 論

甲殼類的神經系統屬於鏈狀神經系統，神經細胞也較集中，其中頭部神經節就是類似脊椎動物腦的雛形，也具有相當發達的感覺器官。本研究結果顯示，白蝦 NPF 基因主要表現在腦、心臟、神經節及眼柄的組織中；而在固定攝食週期下，攝食前 1 hr，NPF 的基因表現量逐漸上升，攝食後則快速下降，推測隨著空腹及饑餓感增加會刺激白蝦神經節 NPF 基因之表現量，在攝食後，因胃中充滿了食物而產生飽足感，在空腹及饑餓感消失的情況下，NPF 基因的表現量隨之下降，由此顯示 NPF 是白蝦表現在神經系統中並與攝食調控有正相關的神經胜肽。

嗅覺神經細胞為雙極的神經細胞 (bipolar neurons)，一端上具有類似纖毛 (cilia) 的構造，具有可與氣味分子結合的嗅覺受體 (olfactory receptor)，而不同的氣味分子會與不同的嗅覺受體結合，進而驅使及誘發甲殼類的攝食行為。在集約養殖下，養殖生物的食物來源幾乎全靠人工飼料來提供，然而，人工飼料與天然飼料相比，其風味和適口性往往存在很大差異，且不同的水產動物也有不同的喜好，所以必須在不同水產動物飼料中添加不同誘引物質，來提高人工飼料的誘食作用 (張, 2007)。本研究使用大蒜萃取物、DMPT 及 TMAO 作為誘引劑，並添加在水體中，結果顯示可促使白蝦 NPF 基因表現量增加，並在處理後 10 ~ 15 min 達到最高，具有顯著的差異 ($p < 0.05$)，其中以 TMAO 的誘引效用最好，促進 NPF 基因表現量增加的效果可持續至 30 min。顯示誘引劑會

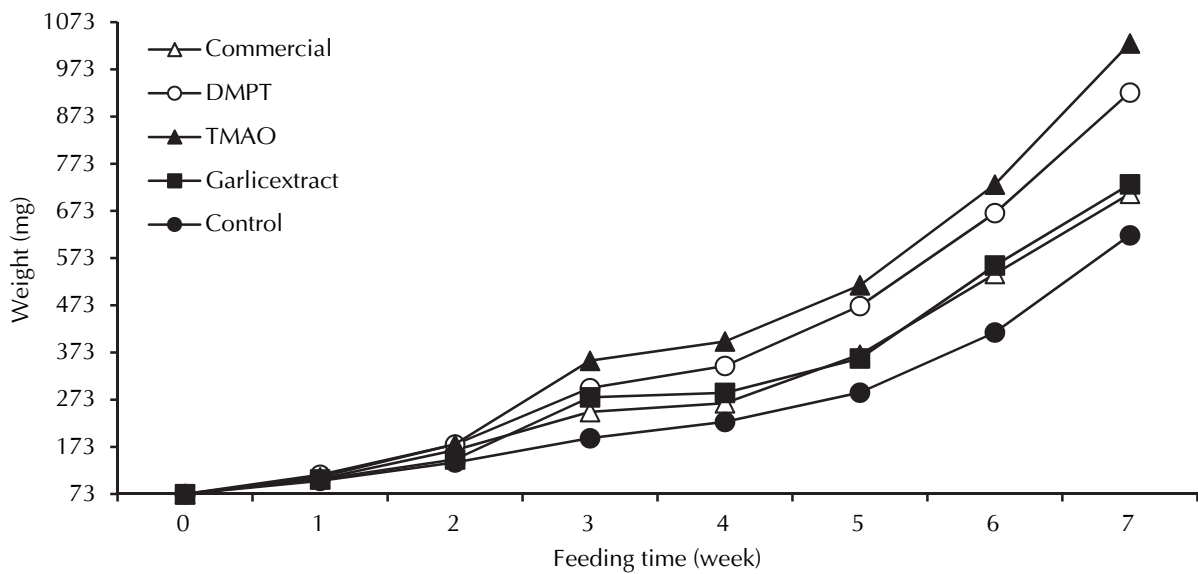


Fig. 7 The body weight of white shrimp fed with attractant-containing diets.

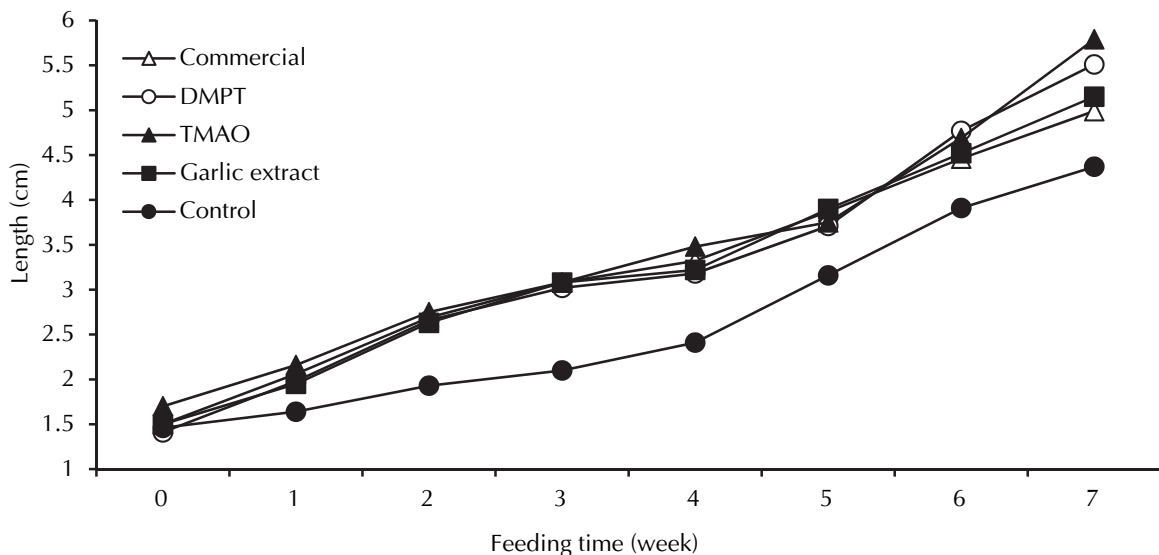


Fig. 8 The body length of white shrimp fed with attractant-containing diets.

透過嗅覺系統，有效促進白蝦內源性的 NPF 基因表現量增加。

為了進一步瞭解內源性 NPF 基因表現量的上升，是否會影響白蝦的攝食及攝食行為，本研究選用 TMAO 做為誘引劑，連續試驗 6 天，紀錄並加以分析。在控制組，在飼料投餵後，白蝦攝食到第一顆飼料所需反應時間需要 37 sec，經過 TMAO 處理後，只需要 13 sec，整個攝食反應的時間縮短了 24 sec。攝食量的方面，在 30 min 內，控制組每隻白蝦平均攝食的飼料量為 7.9 顆，而 TMAO 處理組每隻白蝦平均攝食的飼料量增加至 10.2 顆。

由此結果顯示 NPF 基因表現量的上升，可以促使白蝦的攝食行為發生改變，進而縮短了攝食所需的時間，以及增加了在單位時間內的攝食量。在 Christie *et al.* (2011) 的研究中，透過外源性的添加 NPF 蛋白在水體及飼料中，可以促使白蝦之攝食及促進其成長。然而，利用化學合成的 NPF 價格昂貴，不適合應用至現場養殖。本研究進一步探討將誘引劑添加至人工飼料中，對白蝦攝食及成長的影響。實驗結果顯示，與控制組的飼料相比，添加誘引劑的飼料，都可促進白蝦的體長及體重的增加，在增重率、每日平均增重及每日增重率都呈

現增加的趨勢，飼料中添加大蒜萃取物、DMPT 及 TMAO 的組別在成長相關指標上，也都優於使用的商用飼料。在目前現有的誘引劑檢測法而言，有許多待改進：1. 研究方法的不統一，導致許多試驗結果出現差異；2. 觀察指標不統一，如集魚率、觸球數等，在各文獻中以濃度、時間長短均不相同，且會因觀察者的不同，而有不同之看法，因此對於數據的取得過於主觀，且不易量化導致試驗結果差異；3. 基礎飼料中各基礎因成分的刺激效率並不清楚；4. 若以 X 光檢測化學指標物質，此法必須在第一時間收集魚蝦的糞便，否則散在水中極有可能影響數據，因此通常耗時、又費力；5. 電生理法雖較為準確，但實驗設備十分昂貴以及所需背景知識必須相當專業，不容易廣為推廣（張，2007）。而在神經系統 NPF 基因的表現，不僅會誘發白蝦的攝食行為，也會受到誘引劑的刺激外，NPF 基因表現量的增加也可促使白蝦的攝食量增加，並且 NPF 的基因表現可以透過科學的方式進行量化及統計分析，所以，NPF 的基因表現量具有成為評估誘引劑誘引效果的潛力指標。

本研究首次証實白蝦 NPF 可受到水體中誘引劑的刺激，使其基因表現量增加，並造成攝食行為之改變及攝食量之增加，是白蝦重要的促攝食調控因子，未來可進一步透過營養基因體學等方法，研究 NPF 基因在白蝦成長代謝上扮演之角色，及是否如同魚類具有多種促攝食調控基因之存在，以應用於促進養殖生物的成長。

參考文獻

- 王軍萍, 韓希福 (1994) 魚類誘食劑的研究. 河北漁業, 75: 7-9.
- 李星星, 冷向軍, 李小勤 (2006) 不同誘石劑對銀鯽、奧尼羅非魚作用效果的研究. 糧食與飼料工業, 11: 37-39.
- 宋嘉軒 (2005) 點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 攝食調控因子-神經胜肽 (Neuropeptide Y) 基因之分子選殖及特性分析與其對攝食行為之影響. 國立臺灣海洋大學水產養殖研究所碩士論文, 116 pp.
- 沈輝, 萬夕, 許璞, 姚國興, 陳愛華, 張志勇, 王李寶, 吳國軍, 張曹進, 劉海林 (2010) 脊尾白蝦的行為學觀察研究. 海洋科學, 34(10): 53-56.
- 張文傑 (2007) 誘引劑對於點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 腦內攝食調控基因表現、攝食與成長之影響. 國立臺灣海洋大學水產養殖研究所碩士論文, 142 pp.
- 賈衛斌, 胡波 (1997) 碘化改性大蒜素的應用研究. 中國飼料, 19: 15-16.
- Brown, M. R., J. W. Crim, R. C. Arata, H. N. Cai, C. Chun and P. Shen (1999) Identification of a *Drosophila* brain-gut peptide related to the neuropeptide Y family. *Peptides*, 20(9):1035-1042.
- Christie, A. E., M. C. Chapline, J. M. Jackson, J. K. Dowda, N. Hartline, S. R. Malecha and P. H. Lenz (2011) Identification, tissue distribution and orexigenic activity of neuropeptide F (NPF) in penaeid shrimp. *J. Exp. Biol.*, 214:1386-1396.
- Collins, J. J., 3rd, X. Hou, E. V. Romanova, B. G. Lambrus, C. M. Miller, A. Saberi, J. V. Sweedler and P. A. Newmark (2010) Genome-wide analyses reveal a role for peptide hormones in Planarian germline development. *PLoS Biol.*, 8(10): e1000509.
- Demski, L. S. and R. G. Northcutt (1983) The terminal nerve: A new chemosensory system in vertebrates? *Science*, 220(4595): 435-437.
- Dougan, P. M., G. R. Mair, D. W. Halton, W. J. Curry, T. A. Day and A. G. Maule (2002) Gene organization and expression of a neuropeptide Y homolog from the land planarian *Arthurdendyus triangulatus*. *J. Comp. Neurol.*, 454(1):58-64.
- Gonzalez, R. and I. Orchard (2009) Physiological activity of neuropeptide F on the hindgut of the blood-feeding hemipteran, *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Sci.*, 9: 1-14.
- Humphries, J. E., M. J. Kimber, Y. W. Barton, W. Hsu, N. J. Marks, B. Greer, P. Harriott, A. G. Maule and T. A. Day (2004) Structure and bioactivity of neuropeptide f from the human parasites *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *J. Biol. Chem.*, 279(38): 39880-39885.
- Krashes, M. J., S. DasGupta, A. Vreede, B. White, J. D. Armstrong and S. Waddell (2009) A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell*, 139(2): 416-427.
- Lee, K. S., K. H. You, J. K. Choo, Y. M. Han and K. Yu (2004) *Drosophila* short neuropeptide F regulates food intake and body size. *J. Biol. Chem.*, 279(49): 50781-50789.
- Mendoza, R., J. Montemayor and J. Verde (1997) Biogenic amines and pheromones as feed attractants for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquacul. Nutr.*, 3: 9.

- Nakajima, K. (1992) Activation effect of short term of dimethyl- β -propiothetin supplementation on goldfish and rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 6.
- Narnaware, Y. K. and R. E. Peter (2001) Effects of food deprivation and refeeding on neuropeptide Y (NPY) mRNA mrna levels in goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. & Mol. Biol.*, 129(2-3)B: 633-637.
- Narnaware, Y. K., P. P. Peyon, X. Lin and R. E. Peter (2000) Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. *Am. J. Physiol. Regul., Integ. Comp. Physiol.*, 279(3): R1025-1034.
- Nassel, D. R. and C. Wegener (2011) A comparative review of short and long neuropeptide f signaling in invertebrates: Any similarities to vertebrate neuropeptide Y signaling? *Peptides*, 32(6): 1335-1355.
- Nuss, A. B., B. T. Forschler, J. W. Crim, V. TeBrugge, J. Pohl and M. R. Brown (2010) Molecular characterization of neuropeptide F from the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (kollar) (isoptera: Rhinotermitidae). *Peptides*, 31(3): 419-428.
- Peter, R. E. and L. W. Crim (1979) Reproductive endocrinology of fishes: Gonadal cycles and gonadotropin in teleosts. *Ann. Rev. Physiol.*, 41: 323-335.
- Rajpara, S. M., P. D. Garcia, R. Roberts, J. C. Eliassen, D. F. Owens, D. Maltby, R. M. Myers and E. Mayeri (1992) Identification and molecular cloning of a neuropeptide Y homolog that produces prolonged inhibition in *Aplysia* neurons. *Neuron*, 9(3): 505-513.
- Reidenbach, M. A. and M. A. Koehl (2011) The spatial and temporal patterns of odors sampled by lobsters and crabs in a turbulent plume. *J. Exp. Biol.*, 214(18): 3138-3153.
- Roller, L., N. Yamanaka, K. Watanabe, I. Daubnerova, D. Zitnan, H. Kataoka and Y. Tanaka (2008) The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1147-1157.
- Stanek, D. M., J. Pohl, J. W. Crim and M. R. Brown (2002) Neuropeptide F and its expression in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Peptides*, 23(8): 1367-1378.
- Volkoff, H., L. F. Canosa, S. Unniappan, J. M. Cerda-Reverter, N. J. Bernier, S. P. Kelly and R. E. Peter (2005) Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 142(1-2):3-19.
- Wu, Q., T. Wen, G. Lee, J. H. Park, H. N. Cai and P. Shen (2003) Developmental control of foraging and social behavior by the *Drosophila* neuropeptide Y-like system. *Neuron*, 39(1): 147-161.

Attractants Activate Neuropeptide F Gene Expression to Promote Appetite and Growth in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Chia-Hsuan Sung¹, Ting-Yu Chen² and Jenn-Kan Lu^{2*}

¹Planning and Information Division, Fisheries Research Institute

²Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

Neuropeptide F (NPF) is one of the homologs of vertebrate neuropeptide Y and mainly regulates food intake, metabolism, reproduction, and stress reaction in invertebrate. Feeding regulation genes are widely distributed in the central and peripheral nervous systems and influence appetite and feeding behavior via the inter-regulatory relationship between the two systems. This experiment investigated the effect of the expression of a feeding regulation gene, NPF, on *Litopenaeus vannamei* feeding behaviors and examined its expression in different tissues of shrimp. The results of semi-quantitative RT-PCR analysis showed that NPF gene was dominantly expressed in ganglia and brain. Under the fixed feeding periodicity, the NPF gene expression level significantly increased one hour before feeding, and gradually decreased after feeding. Such attractants as garlic extract, dimethyl propiothetin (DMPT), and trimethylamine N-oxide (TMAO) can significantly promote NPF gene expression in white shrimp. A combined use of DMPT and TMAP has a synergistic effect. TMAO utilization before feeding can significantly increase NPF gene expression in white shrimp ($p < 0.05$), shortening the time they need to search for forage and improving food intake. In this study, we have demonstrated that attractants can improve appetite and ingestion by effecting the expression of NPF gene and showed the relation of NPF to feeding behavior of crustaceans, which makes NPF an important feed regulation gene in white shrimp.

Key words: food intake regulation, neuropeptide F, feed behavior, attractant

*Correspondence: Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University; TEL: (02)2462-2192; FAX: (02)2463-1663; E-mail: f0008@mail.ntou.edu.tw