

中华绒螯蟹螺原体类螺旋蛋白 SLP25 对中华绒螯蟹和 RAW264.7 细胞免疫反应的研究

孟庆国¹, 陈 静¹, 黄艳青², 靳明建³, 顾 伟¹, 王 文¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏省水生甲壳动物病害重点实验室, 江苏 南京 210023)
(2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090)
(3. 江苏省如东县渔业技术推广站, 江苏 如东 226400)

[摘要] 中华绒螯蟹螺原体是一种引起中华绒螯蟹颤抖病的新型病原微生物, 对中华绒螯蟹养殖业造成了很大的损失. 本文研究了螺原体的一个特有蛋白——螺旋蛋白所引起的中华绒螯蟹和小鼠 RAW264.7 细胞的免疫反应. 克隆和原核表达中华绒螯蟹螺原体类螺旋蛋白 SLP25 后, 用以感染中华绒螯蟹和小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 用实时定量 PCR 和 Western Blot 的方法检测宿主免疫相关基因或蛋白表达量的变化. 类螺旋蛋白 SLP25 刺激后, 中华绒螯蟹的抗脂多糖因子、酚氧化酶原、消极素轻链和 Peroxiredoxin 6 等基因的 mRNA 表达量变化显著; RAW264.7 细胞内的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 等基因的 mRNA 表达量变化显著, 而 TGF- β 1 和 CD40 的 mRNA 表达量变化不显著; 同时 RAW264.7 细胞内 P38 和 ERK 蛋白的磷酸化水平变化显著, 而 JNK 蛋白的磷酸化水平变化不显著. 通过本文的研究表明类螺旋蛋白 SLP25 可以引起宿主广泛的免疫变化, 进而证明其是重要的毒力相关因子.

[关键词] 螺原体, 中华绒螯蟹, 螺旋蛋白, 免疫反应

[中图分类号] Q936 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)02-0078-06

Immune Responses of *Eriocheir Sinensis* and RAW264.7 Cells Induced by Spiralin-like Protein SLP25 from *Spiroplasma Eriocheiris*

Meng Qingguo¹, Chen Jing¹, Huang Yanqing², Jin Mingjian³, Gu Wei¹, Wang Wen¹

(1. Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology and Jiangsu Key Laboratory for Aquatic Crustacean Diseases, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)
(2. Key and Open Laboratory of Marine and Estuary Fisheries, Ministry of Agriculture of China, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)
(3. Rudong Station for Fisheries Technology Extension, Rudong 226400, China)

Abstract: *Spiroplasma eriocheiris* caused mass mortality of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. This paper studied the immune responses of *E. sinensis* and RAW264.7 cells induced by a unique gene, spiralin-like protein of *S. eriocheiris*. After cloning and expression the spiralin-like protein in *E. coli*, the role of this protein in promoting immune responses was characterized through analyzing the interactions between *S. eriocheiris* and *E. sinensis* as well as RAW264.7 cells. Real-time PCR and western blot were used for detection of expression levels of immune genes in both hosts. The mRNA expressions of anti-lipopolysaccharide factor, prophenoloxidase, pacifastin light chain and peroxiredoxin 6 in *E. sinensis* and TNF- α , IL-1 β , IL-10 in RAW264.7 cells were induced by spiralin-like protein, whereas TGF- β 1 and CD40 in RAW264.7 cells were not. In RAW264.7 cells, the levels of phosphorylated P38 and phosphorylated ERK increased after spiralin-like protein induced, whereas the level of phosphorylated JNK did not change. This study reveals that spiralin-like protein of *S. eriocheiris* can induce the immune responses of *E. sinensis* and RAW264.7 cells and the protein may be an important virulence factor of *S. eriocheiris*. This study gives light to the pathogenesis of the spiroplasmas and provides

收稿日期: 2012-09-20.
基金项目: 国家自然科学基金(31170120)、江苏省自然科学基金(2011104SBZ0122)、江苏省普通高校自然科学基金(2011104TSJ0154)、江苏省水产三项工程项目(PJ2011-65).
通讯联系人: 王文, 博士, 教授, 研究方向: 水生甲壳动物病害. E-mail: njnuwang@263.net

knowledge of immune reactions of hosts from both invertebrate and vertebrate challenged with spiroplasmas unique protein.

Key words: *Spiroplasma*, Chinese mitten crab, Spiraline, immune responses

中华绒螯蟹(俗称河蟹)是我国重要的经济水生甲壳动物,但是病害一直制约着它的可持续发展,河蟹“颤抖病”是其中最严重的一种病害^[1,2]. 前期研究表明螺原体是中华绒螯蟹颤抖病的致病菌^[3],通过系统分类学、血清学等方面的研究命名该菌株为螺原体的新种 *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov^[4]. 通过 16S rDNA 分析,中华绒螯蟹螺原体与非凡螺原体(*Spiroplasma mirum*)亲缘关系最近^[2]. 而前期研究证实,中华绒螯蟹螺原体不仅能引起河蟹的“颤抖病”,还能像非凡螺原体一样,引起乳鼠产生白内障症状^[5],并且最近研究发现非凡螺原体与疯牛病、羊瘙痒病等脑部的严重疾病相关联^[6].

螺原体属于无细胞壁的柔膜体纲,因此其表面蛋白在黏附、侵入和与宿主相互作用中起到非常重要的作用^[7,8]. 螺旋蛋白(Spiralin)是一种螺原体特有的表面蛋白. 最初,人们认为该蛋白与螺原体的螺旋性、运动型和致病性相关,但后来发现它并不是螺旋性、运动型和致病性的必需蛋白^[9],它是介导柑橘螺原体(*Spiroplasma citri*)在其载体叶蝉中传播的必要蛋白,具有促使螺原体从植物寄主转移到昆虫寄主中的功能^[10]. Killiny 等研究表明,Spiralin 在柑橘螺原体黏附叶蝉肠上皮细胞以通过唾液腺的过程中起到非常重要的作用^[11]. 前期研究中我们已经成功克隆了中华绒螯蟹螺原体 SLP25 基因并进行了原核表达^[12]. 为了研究螺旋蛋白所引起的宿主免疫反应,本文用重组表达的 SLP25 刺激中华绒螯蟹和小鼠巨噬细胞研究它们免疫基因的变化情况,为阐明宿主在对抗 SLP25 所引起的免疫反应和研究细胞通路传导机制奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 菌株

螺原体按照本实验室建立的方法^[2]分离自患“颤抖病”的中华绒螯蟹体内,用 R2 培养基在 30 ℃ 培养.

1.2 动物实验和 Real-time PCR 实验

健康的中华绒螯蟹购自南京某水产品市场(50±3)g,经 PCR、ELISA 和显微镜检测无螺原体等病原菌,分成 2 组(每组 40 只中华绒螯蟹),暂养 1 周后分别注射 PBS(对照组)或 100 μL 重组 SLP25 蛋白(0.1 g/L)(实验组). 期间每天投喂人工配合饲料、每天换水. 分别在感染后的(0、1、3、6、12、24、48、72)h 用 1 mL 医用无菌一次性注射器从中华绒螯蟹附肢关节结合处抽取约 0.2 mL 血淋巴,加入等体积的抗凝剂(葡萄糖 2.05 g,柠檬酸 0.8 g,NaCl 0.42 g,双蒸水定容至 100 mL),每 5 只中华绒螯蟹的样品作为一个混合池,样品 4 ℃、1 000 g 离心 10 min 以收集血细胞.

应用 Trizol (Invitrogen, USA) 方法按照试剂盒说明书提取中华绒螯蟹血细胞的总 RNA,利用 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒(Takara, Japan)反转录总 RNA 为 cDNA. 应用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(Takara, Japan)进行 Real-time PCR 实验对免疫相关基因进行定量. PCR 反应采用 25 μL 反应体系:12.5 μL 2×SYBR Premix Ex Taq、上下游引物分别 1 μL、1 μL 反转录的 cDNA 和 9.5 μL DEPC 处理过的双蒸水. Real-time PCR 程序如下:95 ℃ 预变性 2 min,接着 40 个循环的 PCR 反应(95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s). 用于定量的河蟹免疫基因有 Anti-lipopolysaccharide factor (ALF)、Prophenoloxidase (proPO)、Pacifastin light chain (PLC) 和 Peroxiredoxin 6 (Prx6),同时选择 β-actin 基因作为内参基因,引物序列见表 1. 不同基因的相对表达水平用 2^{-ΔΔCT} 方法(ΔΔCt = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照}) 进行计算,数据分析采用 t 测验方法,当 P<0.05 时被判定为差异显著.

1.3 RAW264.7 细胞培养和 Real-time PCR 实验

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 在 37 ℃、5% CO₂ 条件下,用含 10% 胎牛血清和抗生素(100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)的 1640 完全培养液培养. 培养好的 RAW264.7 细胞加入重组 SLP25 蛋白,分别在诱导刺激后(0、15、30、45、60)min 从细胞中提取总 RNA,反转录成 cDNA,具体操作如上所述. 用于荧光定量 PCR 的反应体系和程序如上所述. 基因相对表达采用 2^{-ΔΔCt} 法计算,以 0 min 处理组作为空白对照组.

用于定量的免疫基因有 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、TGF- β 1 和 CD40,黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(HPRT)作为内参基因.

表 1 实时定量 PCR 引物序列		
Table 1 Specific primers of studied genes used to do Real-time PCR		
	Forward primer	Reverse primer
ALF	5'-GACGCAGGAGGATGCTAAC-3'	5'-TGATGGCAGATGAAGGACAC-3'
proPo	5'-CCATCCCTTCTGCTTACCA-3'	5'-CTCCATCACAAACCCTAACGACTT-3'
PLC	5'-GTGTCAATGGCCGAGGGATC-3'	5'-GACGCAGCGGCAGTTGTTG-3'
Prx6	5'-ACCCATCGGACTACACCCAG-3'	5'-GGACCAATGACAAAGACAGCA-3'
β -actin	5'-GCATCCACGAGACCACTTACA-3'	5'-GCATCCACGAGACCACTTACA-3'
IL-1 β	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3'	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
TNF- α	5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'	5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
CD40	5'-GTCATCTGTGTTTAAAGTCCCG-3'	5'-AGAGAAACACCCCGAAAATGG-3'
TGF- β 1	5'-TGACGTC ACTGGAGTTGTACGG-3'	5'-GGTTCATGTCATGGATGCTGC-3'
IL-10	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
HPRT	5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'

1.4 Western blotting 检测小鼠巨噬细胞 ERK、JNK 和 P38 磷酸化水平

培养 RAW264.7 细胞,用重组 SLP25 蛋白刺激,采用通用蛋白裂解抽提试剂盒提取 SLP25 诱导刺激后的不同时间点的 RAW264.7 细胞的总蛋白,用 BCA 法对总蛋白进行定量. 蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳分离鉴定后,用电转移方法将蛋白转移至 PVDF 膜(Pall,USA);用含有 1% BSA 的封闭液封闭 1h 后,分别加入 MAPK、P38 和 JNK 磷酸化抗体(1:2 000 ~ 1:5 000 稀释于 TBST)(Promega,USA)孵育 2 h;TBST 洗涤后,加入 AP 标记的驴抗兔二抗(1:5000 稀释于 TBST)孵育 1h,TBST 清洗后按照 AP 显色试剂(Promega,USA)的说明书进行显色. 肌动蛋白抗体作为对照.

2 结果

2.1 中华绒螯蟹 Real-time RT-PCR 分析

用重组表达的 SLP25 刺激中华绒螯蟹,收集血淋巴细胞并提取 RNA,Real-time RT-PCR 方法分析各基因表达量的变化情况. 结果如图 1 所示.

如图 1 所示,对照组在 0 h ~ 72 h 表达量变化差异不显著. SLP25 诱导刺激后,血细胞中 ALF mRNA 表达量在 1 h、3 h 和 12 h 时上调,而在 72 h 时表达量下调,其他时间段的变化都不显著;proPo mRNA 表达量在 1 h 和 24 h 表达量上调,而在 3 h、6 h、12 h 和 72 h 时表达量下调;PLC mRNA 表达量在 1 h 和 6 h 时显著增加,而在其他时间段表达量显著减少;Prx6 mRNA 表达量始终显著降低.

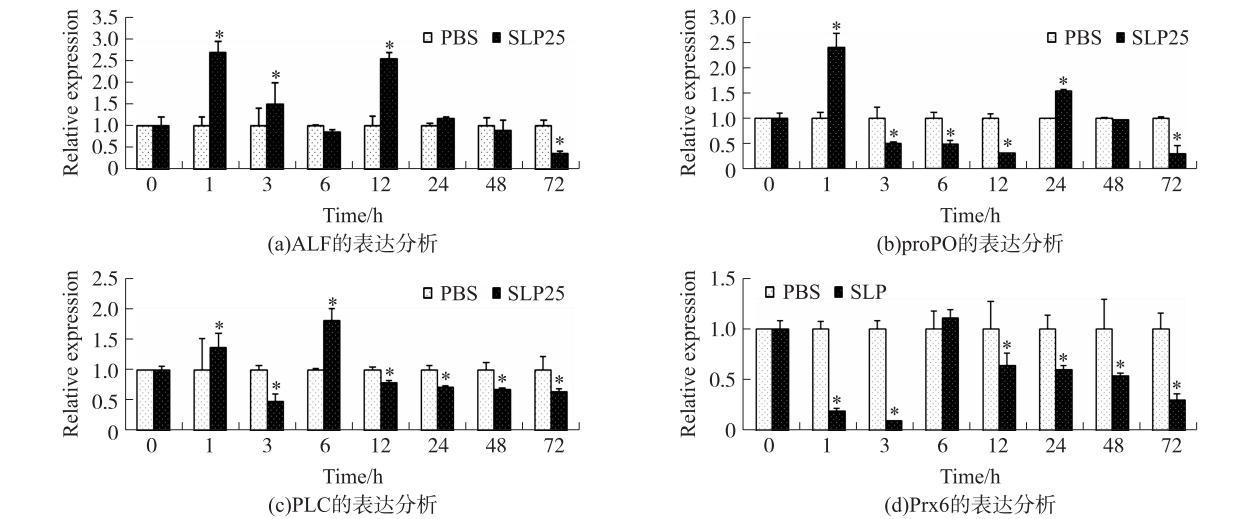


图 1 实时定量 PCR 分析中华绒螯蟹免疫相关基因的表达情况

Fig. 1 The expression levels of ALF, proPO, PLC and Prx6 in *E. sinensis* hemocytes challenged with SLP25

2.2 RAW264.7 细胞 Real-time RT-PCR 分析

用重组表达的 SLP25 刺激 RAW264.7 细胞后,研究免疫相关基因表达量的变化情况,由图 2 可以看出,RAW264.7 细胞中 IL-1 β (30 min)、TNF- α (60 min) 和 IL-10 (0 min ~ 60 min) 的表达量发生了显著变化,而 TGF- β 1 和 CD40 的表达量没有变化。

2.3 RAW264.7 细胞中 ERK、JNK 和 P38 磷酸化水平的分析

我们不仅探讨了 SLP25 刺激后 RAW264.7 细胞免疫相关基因在 mRNA 水平上的变化,还对一些基因在蛋白水平上的表达进行了研究. 我们选择 MAPK 家族中活性蛋白(ERK、JNK 和 P38)的磷酸化水平进行了研究。

如图 3 所示,SLP25 诱导刺激后 ERK 的磷酸化水平逐渐增加,并在 45 min 时到达最大值;P38 的磷酸化水平一直在增加;而 JNK 的磷酸化水平一直处于较低水平,15 min 时最低,而后逐渐增加。

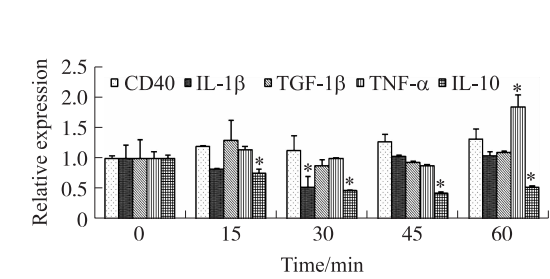


图 2 实时定量 PCR 分析 RAW264.7 细胞相关基因的表达情况

Fig. 2 The expression levels of TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-10 and CD40 in RAW264.7 by Real-time RT-PCR

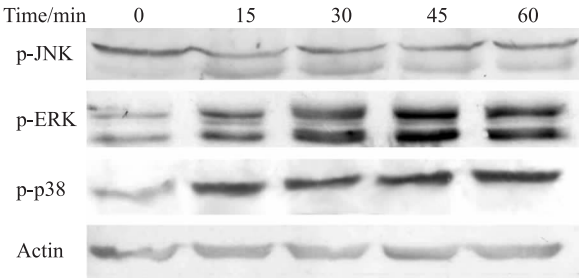


图 3 SLP25 诱导刺激对 RAW264.7 细胞中 ERK、JNK 和 P38 的磷酸化水平的影响

Fig. 3 Effect of SLP25 on MAPKs(ERK, JNK and P38) phosphorylation in RAW264.7 cell

3 讨论

病害的预防和控制是水产养殖业面临的巨大挑战,尽管许多养殖管理技术和养殖方式等已得到了改善,但是中华绒螯蟹“颤抖病”的病害仍然时有发生^[4]. 因此,针对螺原体致病机制方面的研究对于预防该病害的发生具有重要的意义. 螺旋蛋白是螺原体的特有蛋白,它在 *S. citri* 的传播过程中起到非常重要的作用^[10,11]. 虽然水生螺原体 *S. eriocheiris* 与陆生螺原体 *S. citri* 的传播模式不相同,但推测螺旋蛋白在 *S. eriocheiris* 的传染和致病过程中也会起到重要的作用,所以 *S. eriocheiris* 螺旋蛋白的功能还有待于深入研究和确定。

本文中我们选取与螺原体传播密切相关的螺旋蛋白作为研究对象,研究螺旋蛋白与中华绒螯蟹和小鼠巨噬细胞之间的免疫关系. ALF 在甲壳动物先天性免疫中是一个重要的调节因子,它首先被发现作为一种潜在的抗凝剂,可以抑制外毒素介导的激活凝集通路^[13]. 随后的研究显示 ALF 既具有强大的抗革兰氏阴性细菌的活性,又能抑制革兰氏阳性细菌的生长^[14]. 在目前研究的甲壳动物中,白斑综合病病毒(WSSV)可以引起龙虾 *Pacifastacus leniusculus* ALF 基因的上调, RNA 干扰试验表明 ALF 基因可以保护 *P. leniusculus* 以对抗 WSSV 的感染^[15]. 近期研究显示双链 RNA^[16]、鳃弧菌 (*V. anguillarum*)^[17] 和 *S. eriocheiris*^[18] 都可以引起中华绒螯蟹 ALF 基因的上调,这与本试验 SLP25 刺激后的结果一致。

酚氧化酶原系统 (proPO system) 是无脊椎动物体内非常重要的先天性免疫系统,一旦病原侵入机体,酚氧化酶原系统会在丝蛋白酶的催化下使酚氧化酶前体 (proPO) 转变为有活性的酚氧化酶 (phenoloxidase, PO)^[19]. 在无脊椎动物体内,丝蛋白酶和丝蛋白酶抑制剂起到非常重要的一系列的生理作用,它们相互克制,起到动态平衡的作用,例如:食物消化、血淋巴凝结、胚胎发育和免疫反应,一旦它们之间的平衡被打破,生物体正常的新陈代谢出现紊乱,丝蛋白酶以及下游的反应对组织甚至机体起到破坏作用^[20]. 在甲壳动物中,罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 经 CpG 寡核苷酸刺激后^[21]、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 经 LPS 刺激后^[22]、梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 经溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 刺激后^[23], proPO 基因都明显上调;中华绒螯蟹经鳃弧菌^[23] 或 *S. eriocheiris*^[18] 刺激后, proPO 基因也会上调,这与本部分结果相似. 消胞素 (Pacifastin) 是由一系列的丝蛋白酶抑制剂组成的大家族,它由重链和轻链两部分组成. 在本

实验中,SLP25 刺激中华绒螯蟹后,血细胞中的 PLC 基因表达量会上调,这与 *S. eriocheiris*^[18] 和鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)^[25] 刺激的结果相似. 考虑到酚氧化酶原系统是一个多功能的系统,它可以在寄主与病原作用的不同阶段起作用^[26],因此,一般病原刺激后酚氧化酶原相关基因的变化比较复杂.

抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 是一类无硒的过氧化酶家族,它能有效地减少或去除过氧化氢、过氧化亚硝基和其他一系列的过氧化物以保护机体器官细胞对抗外界的氧化压力^[27]. SLP25 刺激中华绒螯蟹后,血细胞中的 *Prx6* 基因表达量显著下调,这也与 *S. eriocheiris*^[18] 和鳃利斯顿氏菌^[28] 刺激后的情况相似. 同样的情况还发生在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)经鳃弧菌刺激后^[29] 和斑节对虾(*Marsupenaeus japonicus*)经肽聚糖刺激后^[30].

与 *S. eriocheiris* 刺激小鼠巨噬细胞相比,SLP25 不能引起小鼠巨噬细胞 CD40 和 TGF- β 1 表达量的变化,并且 IL-1 β 和 IL-10 的表达量变化没有那么大幅度的降低,但是都可以引起 TNF- α 表达量的上调. 可以看出相对于 *S. eriocheiris*,SLP25 对小鼠巨噬细胞的影响较小. 合并发酵支原体(*Mycoplasma fermentans*)脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞后能引起促炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的过表达^[31],然而 IL-10 和 TGF- β 1 在应对不同螺原体脂蛋白刺激时有不同的变化^[32,33]. 因此,我们可以看出 RAW264.7 细胞在应对不同病原刺激时,其细胞因子的反应大不相同. 在上述基因水平的研究基础上,本文还进一步研究了 SLP25 诱导刺激后小鼠巨噬细胞 ERK、JNK 和 P38 磷酸化水平的变化. 丝裂原激活的蛋白激酶(Mitogen activated protein kinases, MAPKs)广泛存在于真核细胞生物中,成员主要包括 ERK1/2、JNK/SAPK、P38 和 ERK5,其中研究最深入的是 P38 介导的信号传导途径. 它们在诱发免疫反应和调节细胞生长和分化等很多生理活动中具有重要的作用^[34]. MAPK 的激活主要通过 MAPK 激酶(MAPKKK)/MAPK 激酶(MAPKK)/MAPK 途径实现磷酸化,发生磷酸化后的一个重要的效应就是激活如 C/EBP、CREB/ATF 和 NF- κ B 等转录因子^[35],从而调控如 TNF- α 、IL-2 等下游基因的表达,激发多种免疫反应. 本试验中 SLP25 诱导刺激后 P38 和 ERK 的磷酸化水平明显地增加,而 JNK 的磷酸化水平下降. 这些表明 JNK、ERK 和 P38 激酶介导的信号通路与 SLP25 诱导的宿主免疫反应密切相关.

综合以上结果,我们初步研究了 SLP25 与寄主之间的免疫反应,我们可以把 *S. eriocheiris* 菌体和其外膜蛋白 SLP25 的主要功能进行比较和研究,由结果看出 SLP25 可以引起中华绒螯蟹 *ALF*、*proPO* 和 *PLC* 基因的上调,以对抗外源物质的进入,这与 *S. eriocheiris* 刺激的效果相同. 在细胞水平上,*S. eriocheiris* 和 SLP25 都可以通过效应元件激活蛋白激酶 ERK 和 P38 的磷酸化,并最终增强下游细胞因子 TNF- α 的表达, TNF- α 表达水平的提高又会通过 P38 途径进一步增强该免疫效应,从而加强宿主对病原的免疫能力. 另外一方面,本研究证明 SLP25 重组蛋白具有一定免疫原性,这为我们今后制备蛋白亚单位疫苗以及从基因水平上预防和控制螺原体病害提供了新的途径.

[参考文献]

- [1] Wang W, Chen J X, Du K H, et al. Morphology of *spiroplasmas* in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* associated with tremor disease[J]. Res Microbiol, 2004, 155: 630-635.
- [2] Wang W, Wen B H, Gasparich G E, et al. A spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Microbiology, 2004, 150: 3 035-3 040.
- [3] Wang W, Rong L W, Gu W, et al. Study on experimental infections of spiroplasma from the Chinese mitten crab in crayfish, mice and embryonated chickens[J]. Res Microbiol, 2003, 154: 677-680.
- [4] Wang W, Gu W, Gasparich G E, et al. *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., a novel species associated with mortalities in *Eriocheir sinensis*, Chinese mitten crab[J]. Int Syst Evol Micr, 2011, 61(3): 2 745-2 752.
- [5] Megraud F, Gamon L B, McGarrity G J. Characterization of *Spiroplasma mirum* (suckling mouse cataract agent) in a rabbit lens cell culture[J]. Infect Immun, 1983, 42: 1 168-1 175.
- [6] Bastian F O, Sanders D E, Forbes W A, et al. *Spiroplasma* spp. from transmissible spongiform encephalopathy brains or ticks induce spongiform encephalopathy in ruminants[J]. Med Microbiol, 2007, 56: 1 235-1 242.
- [7] Chambaud I, Wroblewski H. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system[J]. Trends Microbiol, 1999, 7(12): 493-499.

- [8] Razin S, Yogeve D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas[J]. Microbiol Mol Biol R, 1998, 62(4): 1 094–1 156.
- [9] Duret S, Berho N, Danet JL, et al. Spiralin is not essential for helicity, motility, or pathogenicity but is required for efficient transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector *Circulifer haematoceps*[J]. Appl Environ Microb, 2003, 69: 6 225–6 234.
- [10] Castano S, Blaudez D, Desbat B, et al. Secondary structure of spiralin in solution, at the air/water interface, and its interaction with lipid monolayers[J]. BBA–Biomembranes, 2002, 1 562: 45–56.
- [11] Killiny N, Castroviejo M, Saillard C. *Spiroplasma citri* spiralin acts *in vitro* as a lectin binding to glycoproteins from its insect vector *Circulifer haematoceps*[J]. Phytopathology, 2005, 95(5): 541–548.
- [12] Meng Q, Ou J, Ji H, et al. Identification and characterization of spiralin-like protein SLP25 from *Spiroplasma eriocheiris*[J]. Vet microbiol, 2010, 144(3/4): 473–477.
- [13] Tanaka S, Nakamura T, Morita T, et al. Limulus anti-LPS factor: An anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of coagulation system[J]. Biochem Bioph Res Co, 1982, 105: 717–723.
- [14] Somboonwiwat K, Marcos M, Tassanakajon A, et al. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor(ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29: 841–851.
- [15] Liu H P, Jiravanichpaisal P, Soderhall I, et al. Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication *in vitro* and *in vivo* in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. Virol, 2006, 80: 10 365–10 371.
- [16] Dong C, Zhao J, Song L S, et al. The immune responses in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* challenged with double-stranded RNA[J]. Fish Shellfish Immun, 2009, 26: 438–442.
- [17] Li C H, Zhao J M, Song L S, et al. Molecular cloning, genomic organization and functional analysis of an anti-lipopolysaccharide factor from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32: 784–794.
- [18] 孟庆国. 中华绒螯蟹螺原体比较基因组学及主要功能蛋白的功能研究[D]. 南京: 南京师范大学生命科学学院, 2010.
- [19] Soderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. Curr Opin Immunol, 1998, 10: 23–28.
- [20] Simonet G, Claeys I, Broeck J V. Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods[J]. Com Biochem Phys Pays B, 2002, 132: 247–255.
- [21] Lu K Y, Huang Y T, Lee H H, et al. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns(*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated *in vivo* by CpG oligodeoxynucleotides[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 274–284.
- [22] Ko C F, Chiou T T, Vaseeharan B, et al. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*[J]. Dev Com Immun, 2007, 31: 12–22.
- [23] Chen P, Li J, Li J, et al. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase gene in swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Fish Shellfish Immun, 2010, 28: 106–112.
- [24] Gai Y C, Zhao J M, Song L S, et al. A prophenoloxidase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: gene cloning, expression and activity analysis[J]. Fish Shellfish Immun, 2008, 24: 156–167.
- [25] Gai Y C, Wang L L, Song L S, et al. cDNA cloning, characterization and mRNA expression of a pacifastin light chain gene from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fish Shellfish Immun, 2008, 25: 657–663.
- [26] Lu K Y, Huang Y T, Lee H H, et al. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns(*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated *in vivo* by CpG oligodeoxynucleotides[J]. Fish Shellfish Immun, 2006, 20: 274–284.
- [27] Wood Z A, Schrder E, Robin H J, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins[J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28: 32–40.
- [28] Mu C K, Zhao J M, Wang L L, et al. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin 6 from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fish Shellfish Immun, 2009, 26: 821–827.
- [29] Zhang Q, Li F, Zhang J, et al. Molecular cloning, expression of a peroxiredoxin gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the antioxidant activity of its recombinant protein[J]. Mol Immunol, 2007, 44: 3 501–3 509.
- [30] Maningas B, Koyama T, Kondo H, et al. A peroxiredoxin from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, inhibited by peptidoglycan[J]. Dev Comp Immunol, 2007, 32: 198–203.

- 390.
- [12] 桂建芳. 鱼类性别和生殖的遗传基础及其人工控制[M]. 北京:科学出版社,2007:166-167.
- [13] 鲁翠云,曹顶臣,孙效文,等. 微卫星分子标记辅助镜鲤家系构建[J]. 中国水产科学,2008,15(6):893-901.
- [14] Hänfling B, Weetman D. Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Mol Ecol Notes,2003,3:15-17.
- [15] Ma H T, Chang Y M, Yu D M, et al. Microsatellite variations among four populations of *Eriocheir sinensis*[J]. Zoological Research,2007,28(2):126-133.
- [16] 徐成,王可玲,张培军. 鲈鱼群体生化遗传学研究Ⅱ. 种群生化遗传结构及变异[J]. 海洋与湖沼,2001,32(3):248-254.
- [17] Frankham R, Ballou J, Briscoe D. Introduction to Conservation Genetics[M]. Cambridge:Cam bridge University Press,2010,260-308.
- [18] Chang Y M, Liang L Q, Ma H T, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Chinese Mitten Crab(*Eriocheir sinensis*) [J]. Journal of Genetics and Genomics,2008,35:171-176.
- [19] 潘建林,牟大凯,郝莎,等. 中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 两个地理种群的微卫星 DNA 多态性分析[J]. 南京大学学报:自然科学版,2006,42(5):457-461.
- [20] 许志强,葛家春,李跃华,等. 四水系中华绒螯蟹天然群体遗传特征的微卫星标记分析[J]. 南京大学学报:自然科学版,2011,47(1):82-90.
- [21] 葛家春,许志强,李晓晖,等. 利用线粒体 COI 序列分析 4 水系中华绒螯蟹群体遗传学特征[J]. 中国水产科学,2011,18(1):16-22.
- [22] 李晓晖,许志强,潘建林,等. 中华绒螯蟹人工选育群体的遗传多样性[J]. 中国水产科学,2010,17(2):236-242.
- [23] 许加武,任明荣,李思发. 长江、辽河、瓯江中华绒螯蟹种群的形态判别[J]. 水产学报,1997,21(3):269-274.
- [24] 王武,张文博. 绒螯蟹三个种群形态判别比较[J]. 水产科技情报,2005,32(2):81-83.
- [25] 郑曙明,吴青. 中华绒螯蟹同工酶的研究[J]. 水生生物学报,1994,18(2):183-185.
- [26] 周开亚,高志千. RAPD 标记鉴别中华绒螯蟹种群初步研究[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(2):176-180.
- [27] Zouros E. On the relation between heterozygosity and heterosis:an evaluation of the evidence from marine mollusks[J]. Isozymes Current Topics in Biological and Medical Research,1987,15(3):255-270.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 83 页)

- [31] Rawadi G, Roman-Roman S. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide[J]. Infect Immun,1996,64:637-643.
- [32] Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas[J]. Microbiol Mol Biol R,1998,62:1 094-1 156.
- [33] Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells[J]. Physiol Rev,2003,83:417-432.
- [34] Whitmarsh A J, Davis R J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways[J]. J Mol Med,1996,74:589-607.
- [35] Davis R J. Transcriptional regulation by MAP kinases[J]. Mol Reprod Dev,1995,42:459-467.

[责任编辑:黄 敏]