

池塘养殖尾水灌溉稻蟹共生稻田中水稻的生长

沈玺钦, 李奎, 刘凯, 顾芸, 石伟, 管卫兵

Study on the rice growth in rice-crab culture system irrigated by pond tail water

SHEN Xiqin, LI Kui, LIU Kai, GU Yun, SHI Wei, GUAN Weibing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200302971>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

青田稻-鱼共生系统水稻密度对水稻生长及产量构成的影响

Effects of rice density of Qingtian rice-fish coculture system on rice growth and yield composition

上海海洋大学学报. 2019, 28(6): 890 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190202542>

不同水稻栽培密度下青田稻-鱼共生系统的土壤肥力

Investigation of soil fertility of Qingtian rice-fish coculture system under different rice cultivation densities

水产学报. 2020, 44(5): 805 <https://doi.org/10.11964/jfc.20190111647>

ETS微生物菌肥对养蟹稻田水环境及稻蟹产量的影响

Effects of ETS microbial fertilizer on water environment and total yield of rice-crab fields

渔业现代化. 2017, 44(2): 20 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-9580.2017.02.004>

稻蟹共作与蟹单作模式下中华绒螯蟹肠道及养殖环境细菌群落组成比较

A comparative study of microbiota from the intestine of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and their culture environment, between rice-crab co-culture and crab monoculture models

上海海洋大学学报. 2017, 26(5): 682 <https://doi.org/10.12024/jsou.20170301999>

不同施肥模式下的稻-克氏原螯虾田块水体菌群初探

A preliminary study on the water bacteria of rice-crayfish co-culture paddy field in different fertilization modes

上海海洋大学学报. 2020, 29(4): 516 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190302549>

施肥对幼蟹池塘养殖水质影响的初步探究

Preliminary study on the effect of fertilization on the water quality of crab culture pond

上海海洋大学学报. 2018, 27(6): 884 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180302249>

文章编号: 1674-5566(2021)04-0590-11

DOI:10.12024/jsou.20200302971

RNA 干扰不同类型 *TLR* 基因对罗氏沼虾免疫相关基因表达的影响

袁 伟^{1,2,3}, 戴习林^{1,2,3}, 戈潘缘元¹, 李 云^{1,2,3}, 丁福江⁴

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306; 4. 上海申漕特种水产开发公司, 上海 201516)

摘 要: 通过分别注射 0.4、0.8 和 1.2 $\mu\text{g/g}$ (siRNA/体质量) 小干扰 RNA (short-interfering RNAs, siRNA) 来比较不同剂量 siRNA 对罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) *MrTLR1*、*MrTLR2* 和 *MrTLR3* 等 3 种 *TLR* 基因表达的抑制效果。荧光定量 PCR 检测结果显示 1.2 $\mu\text{g/g}$ 组为最适干扰剂量。注射 *MrTLR1*-siRNA 24 h 以及 48 h 后罗氏沼虾血淋巴中髓样分化因子 88 基因 (*MyD88*)、甲壳素基因 (*Crustin*) 和抗脂多糖因子基因 (*ALF*) 的表达量相对于注射前均显著下降, 同时 *MrTLR2* 在鳃中的相对表达量上升; 在注射 *MrTLR2*-siRNA 后, *MyD88* 以及 *Crustin* 在血淋巴中的相对表达量明显下降; 而在注射 *MrTLR3*-siRNA 后, 免疫缺陷同系物基因 (*IMD*) 在鳃中的相对表达量显著上升, 同时 *ALF* 在血淋巴中的相对表达量显著上升。此外, 3 种 *TLR* 基因的沉默对酚氧化酶原基因 (*proPO*) 的表达没有影响。研究结果表明: *MrTLR1* 和 *MrTLR2* 可调控 *MyD88* 以及抗菌肽的表达; 而 *MrTLR3* 不仅参与 Toll 信号通路调控, 同时也可能影响 *IMD* 信号通路。

关键词: 罗氏沼虾; siRNA; Toll 样受体基因; RNA 干扰; 免疫相关基因

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 是我国重要的养殖虾类之一。原产于东南亚地区, 主要在淡水或咸淡水水域中生存, 具有生长迅速、营养价值高等优点。但长时间的病害问题对罗氏沼虾产业发展造成很大限制^[1], 因此需要研究其先天免疫机制, 为罗氏沼虾的病害防控提供参考。

由于获得性免疫的缺乏, 甲壳动物主要依赖先天性免疫作为自身的主要防御体系, 其中免疫信号通路扮演着重要角色。当病原微生物入侵时, 先天免疫信号通路中的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别并结合病原微生物自身具有的病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 随后 PRRs 与 PAMPs 的结合体将免疫信号通路激活, 从而调控下游的免疫相关基因如溶菌酶、酚氧化酶原 (prophenoloxidase, proPO) 以及抗菌肽 (anti-

microbial peptides, AMPs) 等来对抗病原微生物。目前在虾先天免疫系统发现的 3 种主要信号通路为 JAK/STAT 信号通路、IMD 信号通路以及 Toll 信号通路。其中: JAK/STAT 信号通路主要参与对病毒引起的免疫反应; IMD 信号通路则主要通过调控抗菌肽的表达来防御细菌入侵; 而 Toll 信号通路可以介导细菌和病毒所引起的先天免疫反应^[2]。

作为先天免疫信号通路中主要的 PRRs 之一, Toll 样受体可以通过识别多种 PAMPs 或通过识别体内的代谢产物来激活先天免疫系统, 它是先天性免疫与获得性免疫的结合点^[3], 具有较高保守性的特点。在脊椎动物中, Toll 样受体 (TLRs) 是一种跨膜受体, 主要包括胞外区亮氨酸重复结构域 (leucine rich repeat, LRR)、跨膜区以及位于胞内的 Toll/白介素 1 受体结构域 (Toll/IL-1R domain, TIR)。其中: LRR 结构域主要通过

收稿日期: 2020-03-23 修回日期: 2020-06-15

基金项目: 上海市现代农业产业技术体系 (虾类项目) (沪农科产字[2016]第 5 号)

作者简介: 袁 伟 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: 407704657@qq.com

通信作者: 李 云, E-mail: likumo@163.com

识别并结合配体来启动信号通路,不同的 TLR 可选择性识别特异性配体;而 TIR 结构域可以通过募集接头蛋白来启动下游信号转导,从而激活相关免疫转录因子启动先天免疫。目前,相关研究在人类体内发现了 11 种 TLR,在小鼠 (*Mus musculus*) 中则发现 13 种 TLR^[4],它们都具有高度同源性。在无脊椎动物中,Toll 样受体最早在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 体内发现^[5-6]。与脊椎动物不同,果蝇 Tolls 不可以与 PAMPs 直接结合,需要通过活化 Spätzle 配体然后与 Toll 的 LRR 结构域结合形成二聚体,胞内 TIR 与包含死亡结构域的蛋白 MyD88、Tube、Pelle 相互作用形成异源三源体,随后 Cactus 磷酸化并水解,导致转录因子 Did 和 Dorsal 释放,最终调控抗菌肽等免疫相关基因的表达来进行免疫防御。在果蝇体内共发现 9 种 Toll 样受体,*Toll1* 参与果蝇生长与免疫^[6]; *Toll2* 参与果蝇胚胎发育^[7]; *Toll7* 和 *Toll8* 可能调控果蝇的生长^[8]; *Toll9* 可以激活免疫相关基因的表达^[9]。同时,2007 年虾类首个 Toll 样受体基因在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 中被发现并鉴定^[10]。随后,陆续在斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[11]、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[12]、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)^[13]、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)^[14]、罗氏沼虾^[15] 等多种虾体内发现 Toll 样受体基因。目前在凡纳滨对虾以及罗氏沼虾体内都发现了 3 种不同类型 TLR,然而不同类型的 TLR 在虾先天免疫调控中的生理功能差异研究尚处于起步阶段。

本实验包括 2 个部分,首先通过荧光定量 PCR 技术检测罗氏沼虾 3 种 TLR 基因在 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)^[16] 过程中的相对表达量来探索 RNAi 的最适注射剂量和观察时间。随后在 RNA 干扰下测定分析多种免疫相关基因的相对表达量来研究 3 种 *MrTLRs* 的免疫调控功能。为进一步研究罗氏沼虾的免疫调控机制以及不同类型 TLR 之间的免疫功能差异提供一定的研究基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与养殖管理

实验用罗氏沼虾共 400 只,取自上海申漕特种水产开发有限公司,体质量为 (8.0 ± 0.5) g,规

格统一,体表无损伤。实验虾暂养于 55 个容积为 400 L 的水箱中(长 78 cm,宽 58 cm,高 46 cm)。水箱中加入 200 L 水,其间保持水温为 (27.0 ± 1.0) °C,盐度为 2,pH 为 8.0 ± 0.2 ,提供自然光照,每日吸污 1 次并更换 50% 水体,养殖 3 d 后开始正式实验。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计

实验开始前,随机抽取实验用虾进行白斑综合征病毒和溶藻弧菌感染检测,以确保实验用虾不存在病原体感染。将实验用虾分为 5 个大组依次为空白对照组、阴性对照组、*MrTLR1* 干扰组、*MrTLR2* 干扰组、*MrTLR3* 干扰组,其中每个干扰组分为 0.4、0.8 和 1.2 $\mu\text{g/g}$ (siRNA/体质量) 等 3 个剂量组,每组 30 尾虾。空白对照组与阴性对照组分别注射磷酸缓冲液 (Phosphate buffer saline, PBS) 与 scrambled-siRNA,干扰组注射 *MrTLR*-siRNA。于腹肢第二小节进行注射,注射 100 μL PBS、scrambled-siRNA 或 siRNA,分别于注射后 0、6、12、24 和 48 h 随机采集每组 3 只实验用虾的血液和鳃组织样品保存于 RNA keeper 溶液 (南京诺唯赞生物科技有限公司) 中,于 -80 °C 冰箱中保存。本实验中所有操作均符合上海海洋大学实验动物伦理委员会规范。

1.2.2 总 RNA 的提取及反转录

组织匀浆后,RNA isolater (南京诺唯赞生物科技有限公司) 抽提总 RNA, Nanodrop2000 (Thermo Scientific) 测定其浓度及纯度,测得 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.8 ~ 2.0,判定 RNA 的纯度符合要求可用于后续实验。RNase-Free 水稀释总 RNA 质量浓度至 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$, -80 °C 备用。HiScript II RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper) 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司) 反转稀释后总 RNA 获得 cDNA。

1.2.3 引物及 siRNA 设计

根据 NCBI GenBank 罗氏沼虾 *MrTLR1* (KJ188410.1)、*MrTLR2* (KJ188411.1)、*MrTLR3* (KJ188412.1) 和 *Mr18S rRNA* (GQ131934.1) 序列以及相关免疫基因 *MyD88*、*Crustin*、*ALF*、*IMD* 和 *proPO* 在其序列保守区域采用软件 PrimerPremier 6.0 分别设计引物,根据 3 种 *MrTLR* 基因的全长序列设计 siRNA,引物序列及 siRNA 序列见表 1。所用引物委托生工生物工程(上海)有限公司合

成,所用 scrambled-siRNA 及 siRNA 由锐博生物 科技有限公司合成。

表 1 引物及 siRNA 序列
Tab.1 Sequences of the primers or siRNA

引物名称 Primer	序列 Sequence	作用 Function
<i>Mr18S rRNA</i> -F	5'-TGTTACGGGTGACGGA-3'	荧光定量 PCR
<i>Mr18S rRNA</i> -R	5'-AATTACGCAGACTCGGAAGA-3'	荧光定量 PCR
<i>MrTLR1</i> -F	5'-ATACAGCAGCCATTGTC-3'	荧光定量 PCR
<i>MrTLR1</i> -R	5'-TTCTTCTTCAGCCACAGC-3'	荧光定量 PCR
<i>MrTLR2</i> -F	5'-TTCTACGACCGCAACGAG-3'	荧光定量 PCR
<i>MrTLR2</i> -R	5'-CGGAGTGGGAGTGAACAG-3'	荧光定量 PCR
<i>MrTLR3</i> -F	5'-ATCTCGGGCGTGTTC-3'	荧光定量 PCR
<i>MrTLR3</i> -R	5'-CTGGCTGTCTGTGACTTTCC-3'	荧光定量 PCR
<i>IMD</i> -F	5'-CGACCACATTCTCCTCCTCCC-3'	荧光定量 PCR
<i>IMD</i> -R	5'-TTCAGTGCATCCACGTCCTC-3'	荧光定量 PCR
<i>Crustin</i> -F	5'-AATGGCTCGTCTTTGTGCTTT-3'	荧光定量 PCR
<i>Crustin</i> -R	5'-CTTTCCACGGGTGCTTAGGT-3'	荧光定量 PCR
<i>ALF</i> -F	5'-CGGATTGTCGGGTTGTGGC-3'	荧光定量 PCR
<i>ALF</i> -R	5'-CTTCTCCTTTGATGGGGGT-3'	荧光定量 PCR
<i>MyD88</i> -F	5'-GAGTCATGTCAGGCCTACGA-3'	荧光定量 PCR
<i>MyD88</i> -R	5'-CACAGCTAGACCCCTCCAAT-3'	荧光定量 PCR
siRNA- <i>MrTLR1</i>	5'-CACCCACAATGATATATCA-3'	RNA 干扰
siRNA- <i>MrTLR2</i>	5'-CTTTGTATGTTGCCTTTTA-3'	RNA 干扰
siRNA- <i>MrTLR3</i>	5'-GAACCAACAGGTCCTTCCT-3'	RNA 干扰
scrambled-siRNA	5'-TCTCTTCACAGCCGAAGAA-3'	RNA 干扰

1.2.4 荧光定量 PCR

设定 20.0 μ L 反应体系:SYBR Premix Fx *Taq* 10.0 μ L,取上文实验中所得 cDNA 2.0 μ L(100 ng),上、下游引物各 0.8 μ L,ddH₂O 6.4 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环,根据溶解曲线分析 PCR 产物质量。根据预实验结果以及本实验室团队之前的研究发现 *MrTLR1*、*MrTLR2*、*MrTLR3* 和 *IMD* 主要在鳃中表达,而 *ALF*、*Crustin* 和 *proPO* 主要在血淋巴中表达,故本实验选择在鳃组织中检测分析 3 种 *MrTLRs* 以及 *IMD* 的表达量,在血淋巴中检测分析 *ALF*、*Crustin* 和 *proPO* 的表达量。

1.2.5 数据处理

采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法对所测基因进行表达量分析,以罗氏沼虾 *Mr18S rRNA*(GQ131934.1)为内参基因。所有数据采用平均值 \pm 标准差 (Means \pm SD) 表示。以 SPSS 17.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA),当 $P < 0.05$ 认为差异显著。

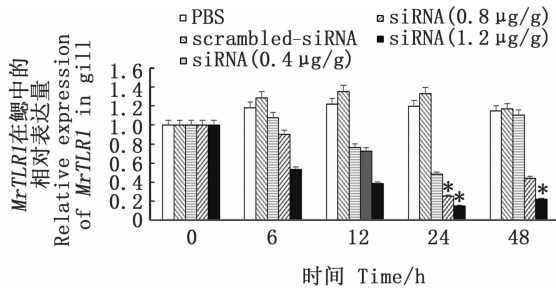
2 结果

2.1 *MrTLRs* 基因的干扰规律分析

在 *MrTLR1* 的 RNA 干扰实验中,siRNA (0.4 μ g/g) 组对 *MrTLR1* 的抑制效果不显著,而 siRNA (0.8 μ g/g) 组以及 siRNA (1.2 μ g/g) 组对 *MrTLR1* 均有显著的抑制效果。由图 1 可以看出:siRNA (0.4 μ g/g) 组、siRNA (0.8 μ g/g) 组以及 siRNA (1.2 μ g/g) 组在注射后 6、12、24 h *MrTLR1* 基因的表达量出现下降,而在注射后 48 h 表达量升高;siRNA (0.4 μ g/g) 组对 *MrTLR1* 的抑制效果不显著;siRNA (0.8 μ g/g) 组在注射后 24 h *MrTLR1* 的表达量得到显著抑制 ($P < 0.05$),为 0 h 表达量的 25%,siRNA (1.2 μ g/g) 组在注射后 24 h 以及 48 h 表达量得到显著抑制 ($P < 0.05$),其中注射后 24 h 抑制效果最明显,为 0 h 表达量的 15%。

在 *MrTLR2* 的 RNA 干扰实验中,siRNA (0.4 μ g/g) 组、siRNA (0.8 μ g/g) 组以及 siRNA (1.2 μ g/g)

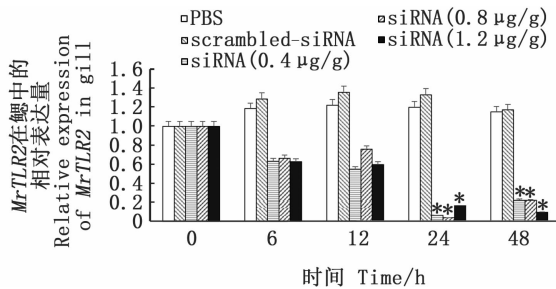
组对 *MrTLR2* 均有显著的抑制效果 ($P < 0.05$)。从图 2 可以看出:siRNA (0.4 $\mu\text{g/g}$) 组和 siRNA (0.8 $\mu\text{g/g}$) 组在注射之后 *MrTLR2* 的基因表达量均出现先下降后上升,在注射后 24 h 两组表达量均显著降低 ($P < 0.05$) 且达到最低水平,分别为 0 h 表达水平的 6% 与 4%;siRNA (1.2 $\mu\text{g/g}$) 组 *MrTLR2* 的基因表达量呈现下降趋势,注射后 24 和 48 h 抑制显著 ($P < 0.05$),在注射后 48 h 达到最低水平,为 0 h 表达量的 21%。



柱状图上方“*”代表与 0 h 的数据相比差异显著 ($P < 0.05$)。
“*” above the bar represented significant difference ($P < 0.05$) compared with the data at 0 h.

图 1 罗氏沼虾鳃中 *MrTLR1* 基因在 RNA 干扰实验中的表达变化情况

Fig.1 Expression of *MrTLR1* in gill of *Macrobrachium rosenbergii* during RNA interference



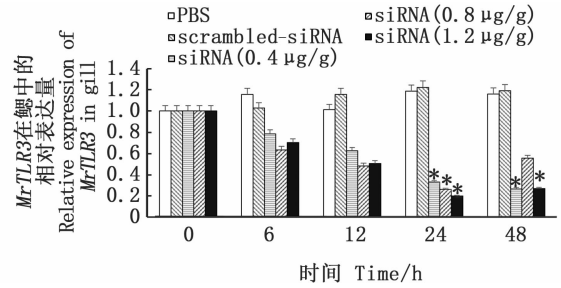
柱状图上方“*”代表与 0 h 的数据相比差异显著 ($P < 0.05$)。
“*” above the bar represented significant difference ($P < 0.05$) compared with the data at 0 h.

图 2 罗氏沼虾鳃中 *MrTLR2* 基因在 RNA 干扰实验中的表达变化情况

Fig.2 Expression of *MrTLR2* in gill of *Macrobrachium rosenbergii* during RNA interference

在 *MrTLR3* 的 RNA 干扰实验中,siRNA (0.4 $\mu\text{g/g}$) 组、siRNA (0.8 $\mu\text{g/g}$) 组以及 siRNA (1.2

$\mu\text{g/g}$) 组对 *MrTLR3* 均有显著的抑制效果 ($P < 0.05$)。图 3 显示:siRNA (0.4 $\mu\text{g/g}$) 组呈现下降趋势,在注射后 24 h 以及 48 h 抑制效果显著 ($P < 0.05$),在注射后 48 h *MrTLR3* 基因表达水平最低,为 0 h 表达量的 26%;siRNA (0.8 $\mu\text{g/g}$) 组与 siRNA (1.2 $\mu\text{g/g}$) 组表达量都呈现先下降后上升,并均在注射后 24 h 达到最低水平且抑制效果显著 ($P < 0.05$),分别为 0 h 表达量的 26% 和 19%。



柱状图上方“*”代表与 0 h 的数据相比差异显著 ($P < 0.05$)。

“*” above bar represented significant difference ($P < 0.05$) compared with the data at 0 h.

图 3 罗氏沼虾鳃中 *MrTLR3* 基因在 RNA 干扰实验中的表达变化情况

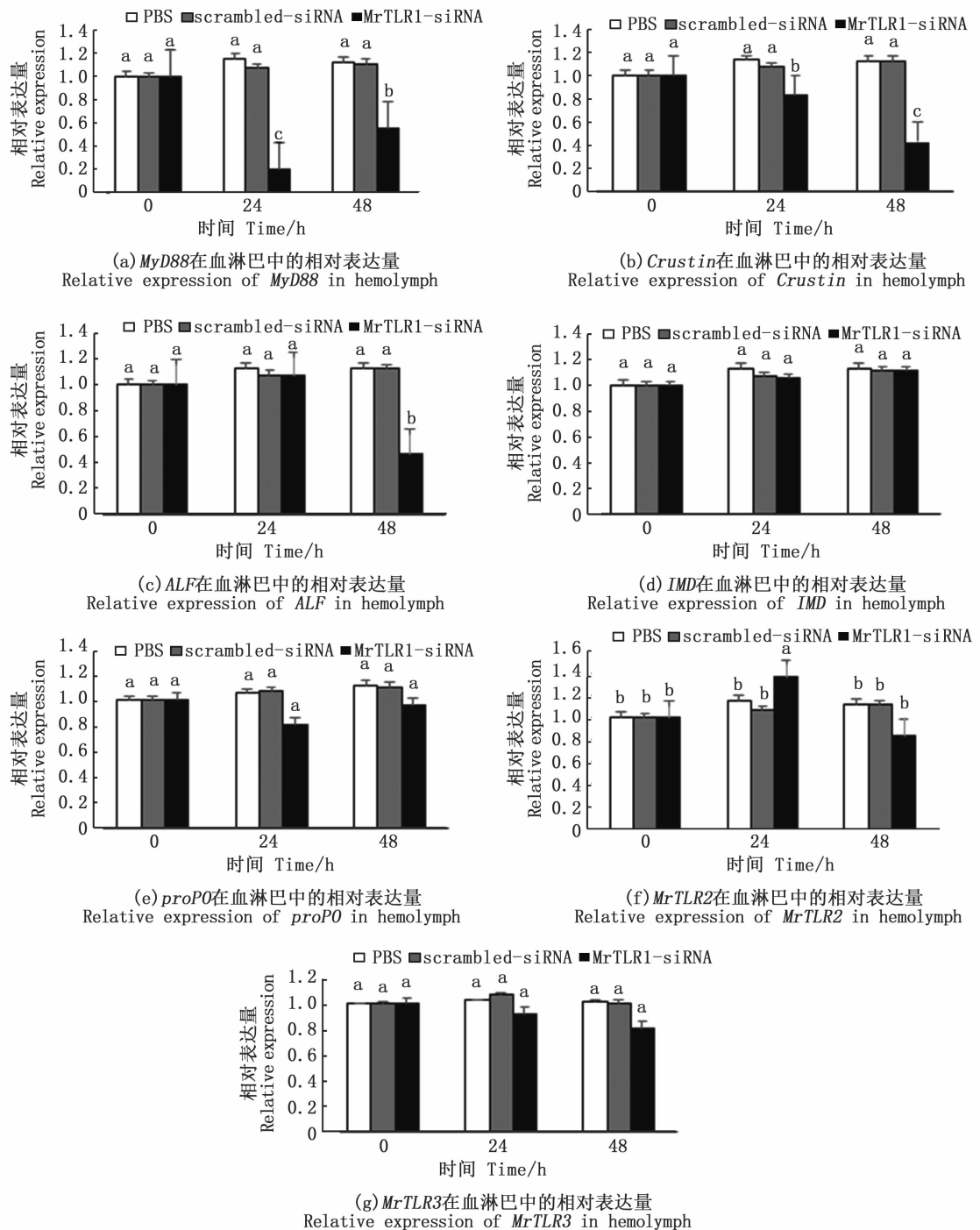
Fig.3 Expression of *MrTLR3* in gill of *Macrobrachium rosenbergii* during RNA interference

2.2 *MrTLRs* 基因沉默后相关免疫基因的表达分析

基于上文 *MrTLRs* 基因干扰实验的结果,本实验选取 1.2 $\mu\text{g/g}$ 剂量组 0、24 以及 48 h 鳃组织和血液样品进行研究分析。

2.2.1 *MrTLR1* 基因沉默后对其他免疫基因表达影响

图 4 显示,*MyD88* 基因表达水平呈现先下降后上升的规律。其中:注射 siRNA 后 24 h 表达量达到最低,与 0 h 相比显著降低 ($P < 0.05$),为 0 h 表达量的 20%;*Crustin* 基因的表达量随着时间变化而逐渐降低,在注射后 48 h 表达量下降显著 ($P < 0.05$),为 0 h 表达量的 43%;*ALF* 基因在注射后 48 h 表达量呈现显著降低 ($P < 0.05$),为 0 h 表达量的 47%;*IMD* 基因无显著变化;*proPO* 基因相对表达量无显著变化;*MrTLR2* 基因在注射后 24 h 的表达量显著升高 1.36 倍 ($P < 0.05$),而 *MrTLR3* 无显著变化。



图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters in the figure represented significant difference($P < 0.05$).

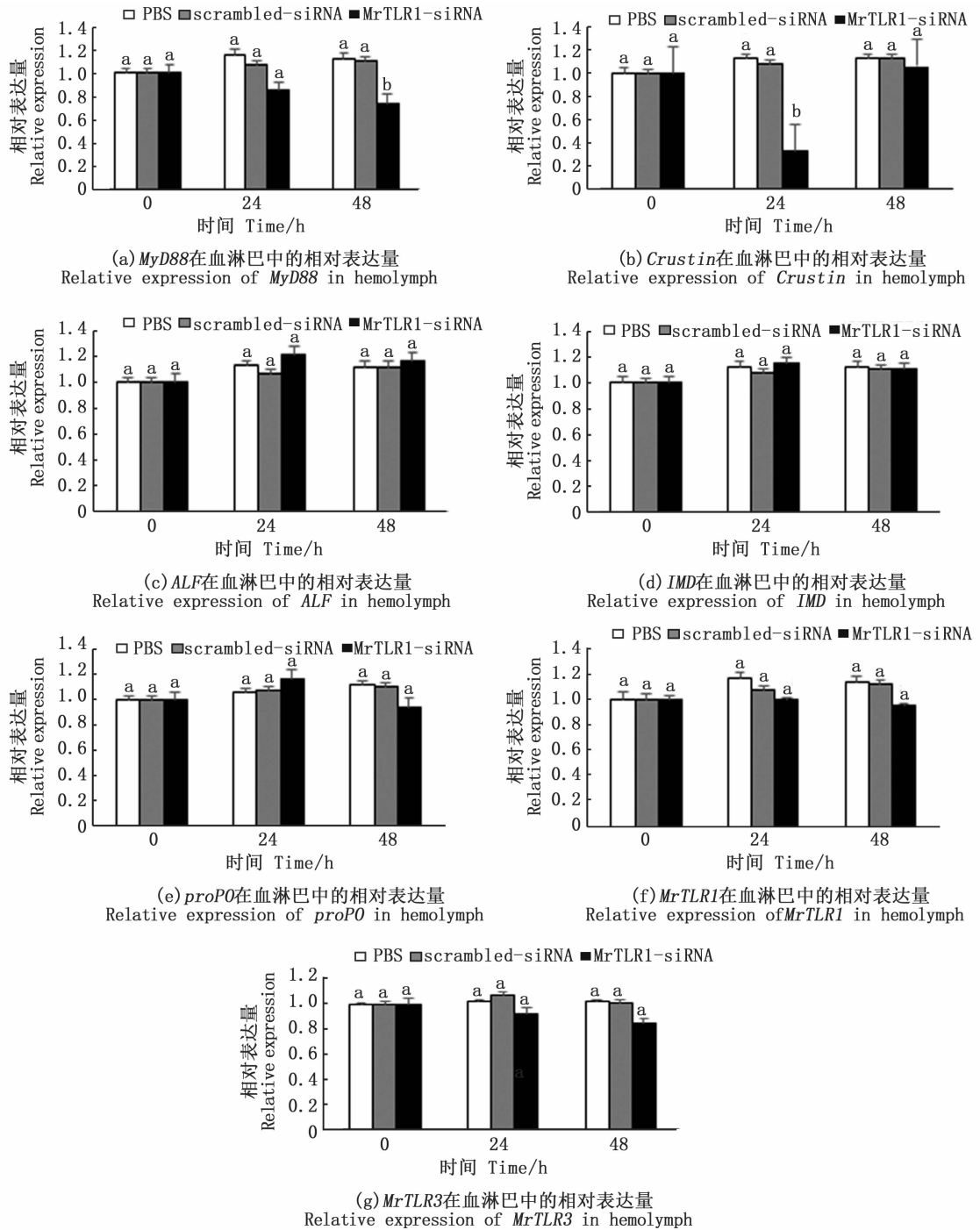
图4 罗氏沼虾 *MrTLR1* 基因沉默后不同免疫相关基因的表达变化情况

Fig. 4 Expression of different immune-related genes in *MrTLR1* silenced *Macrobrachium rosenbergii*

2.2.2 *MrTLR2* 基因沉默后对其他免疫基因表达影响

由图5可知:*IMD*、*proPO*、*ALF*、*MrTLR1* 以及 *MrTLR3* 基因表达量均无显著变化;*MyD88* 基因表达量呈现下降趋势,在48 h表达量显著降低

($P < 0.05$),为0 h表达量的74%;*Crustin* 基因在注射后24 h的表达量较0 h出现显著抑制($P < 0.05$),为0 h表达量的33%,而注射后48 h则无显著差异。



图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters in the figure represented significant difference($P < 0.05$).

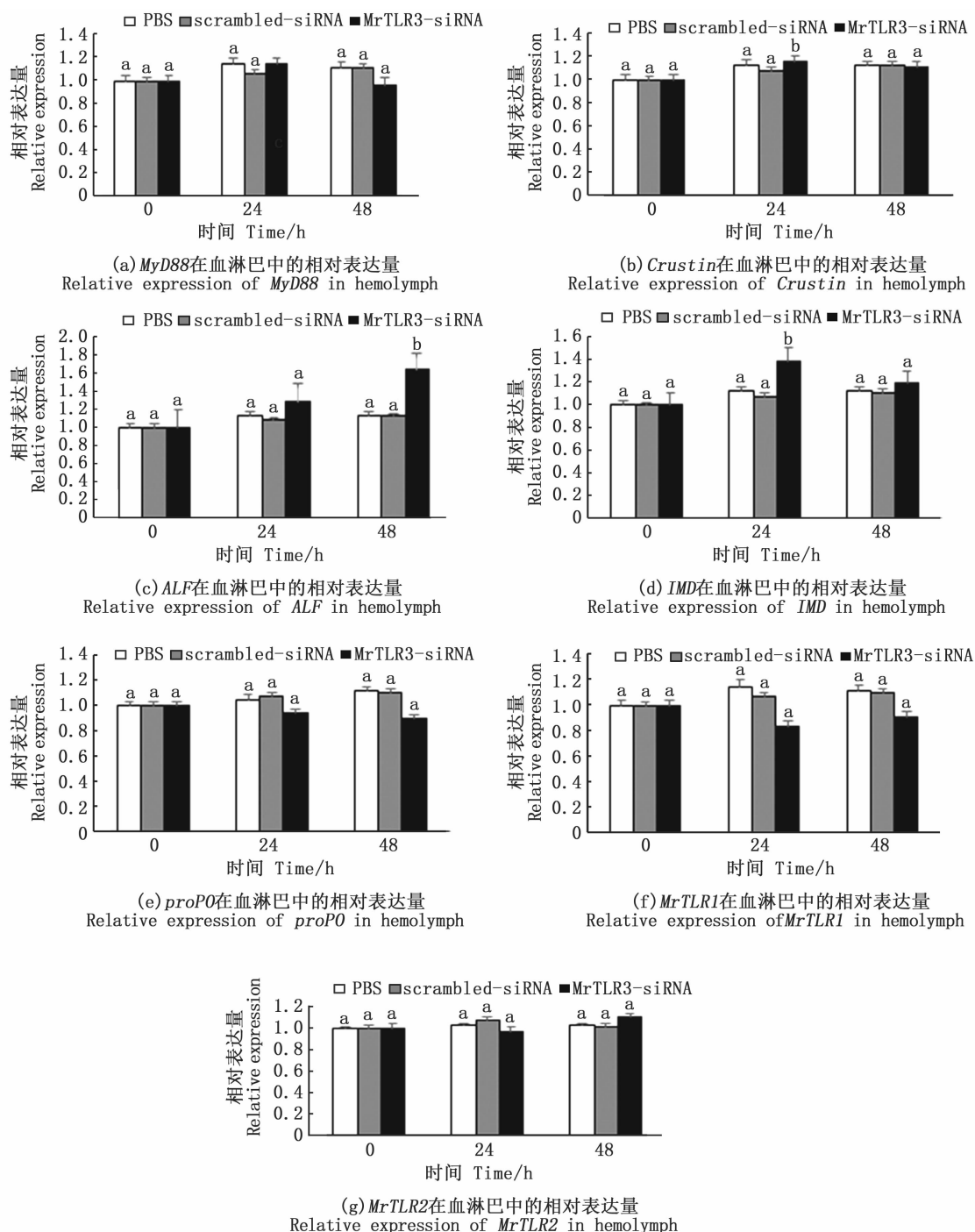
图 5 罗氏沼虾 *MrTLR2* 基因沉默后不同免疫相关基因的表达变化情况

Fig. 5 Expression of different immune-related genes in *MrTLR2* silenced *Macrobrachium rosenbergii*

2.2.3 *MrTLR3* 基因沉默后对其他免疫基因表达影响

由图 6 可知:*ALF* 基因在注射后 24 h、48 h 均出现显著升高并呈现上升趋势($P < 0.05$),在注

射后 48 h 表达量最高,为 0 h 表达量的 1.63 倍;*IMD* 基因在注射后 24 h 表达出现显著升高($P < 0.05$),为 0 h 表达量的 1.40 倍;*MyD88*、*Crustin*、*proPO*、*MrTLR1* 以及 *MrTLR2* 基因均无显著变化。



图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters in the figure represented significant difference($P < 0.05$).

图6 罗氏沼虾 *MrTLR3* 基因沉默后不同免疫相关基因的表达变化情况

Fig. 6 Expression of different immune-related genes in *MrTLR3* silenced *Macrobrachium rosenbergii*

3 讨论

TAN 等^[17]在研究罗氏沼虾 *MrIR* 基因 siRNA 干扰的最适剂量的实验中设计了 0.1、0.5、1.5 和 3.0 $\mu\text{g/g}$ 等 4 个组,发现 0.5 $\mu\text{g/g}$ 剂量对 *MrIR*

基因的沉默效果最佳。FENG 等^[18]对罗氏沼虾注射 siRNA 沉默 *MrToll* 基因,每只注射 15 μg siRNA (0.75 ~ 1.00 $\mu\text{g/g}$),在第 24 h 时 *MrToll* 基因的表达量得到极显著抑制。本实验中也发现不同剂量 siRNA 对罗氏沼虾 3 种 *TLRs* 基因的干

扰效果有明显影响。其中,0.4 $\mu\text{g/g}$ 组对 *MrTLR1* 干扰效果不显著,而 0.8 $\mu\text{g/g}$ 组与 1.2 $\mu\text{g/g}$ 组对 3 种 *MrTLRs* 均具有显著抑制,在 *MrTLR1* 以及 *MrTLR3* 的干扰实验中 0.8 $\mu\text{g/g}$ 组在注射后 24 h 抑制效果显著,但在注射后 48 h *MrTLR1* 和 *MrTLR3* 的表达量出现上升,抑制效果不显著;1.2 $\mu\text{g/g}$ 组在注射后 48 h 对 3 种 *MrTLRs* 仍有显著抑制效果。除此之外,不同剂量 siRNA 干扰后 Toll 样受体基因的最低表达量在 3 个剂量组间并无显著差异,其中 1.2 $\mu\text{g/g}$ 组未能将目的基因表达量抑制到更低水平,这与江丰伟等^[19]对青虾 *transformer-2* 基因 RNA 干扰规律研究中的结果相似,在达到一定剂量以后 RNA 干扰素对基因表达的抑制效果并不随着剂量的升高而发生变化。田宏刚等^[20]认为存在于昆虫血淋巴或肠道内的核酸酶可以降解 dsRNA 或 siRNA,从而影响 RNAi 的效率。由此推测罗氏沼虾对 siRNA 的干扰剂量存在一定的耐受范围,不会使被沉默的基因表达量下降得过低。还有研究表明不同虾类注射不同类型干扰素对目的基因的干扰持续时间不同。关于虾类 RNAi 的研究报道有:江丰伟等^[19]对青虾注射 4 $\mu\text{g/g}$ dsRNA 对 *transformer-2* 基因的有效干扰可持续一周;TAN 等^[17]对罗氏沼虾注射 0.5 $\mu\text{g/g}$ siRNA 沉默 *MrIR* 基因,有效干扰效果持续 5 d,同时 TAN 又发现注射 dsRNA 达到同样干扰效果时所需剂量在 4~5 $\mu\text{g/g}$ 。综上分析,RNA 干扰素的剂量及类型都可能对 RNA 干扰效果产生影响,因此,综合之前干扰时间及剂量实验的结果,选取 1.2 $\mu\text{g/g}$ 剂量作为本实验中 siRNA 的最佳干扰剂量,并选用注射后的 24 h 和 48 h 作为最佳观察时间。

在将罗氏沼虾 *MrTLR1* 和 *MrTLR2* 沉默之后,*MyD88* 基因的表达均被显著抑制,最低表达量分别为 0 h 表达量的 20% 和 73%;然而沉默 *MrTLR3* 并没有对 *MyD88* 的表达产生显著影响。DEEPIKA 等^[21]研究发现 *MyD88* 参与斑节对虾对 WSSV 的免疫应答;CHEN 等^[22]发现沉默拟穴青蟹 *SpToll1* 后,*MyD88* 的表达被极显著抑制,沉默 *SpToll2* 后,*MyD88* 的表达则被显著抑制;可以推测 *MrTLR1* 和 *MrTLR2* 都参与 *MyD88* 基因的表达调控且 *MrTLR1* 对 *MyD88* 的调控影响更大,罗氏沼虾 *MrTLR3* 对 *MyD88* 的表达水平没有显著

影响。*MyD88* 在 Toll 信号通路中发挥着重要作用,首先病原入侵后,机体产生 Spätzle 配体,Spätzle 与 TLR 的 LRR 结构域结合启动信号通路,随后 *MyD88* 与 TLR 两者的 TIR 结构域相互作用使得 *MyD88* 召集到 TLR 受体上,*MyD88* 再通过其死亡结构域与 IRAK(interleukin-1 receptor associated kinase)相互作用并激活 IRAKs,从而启动 Toll 信号通路下游的免疫应答并最终激活转录因子 NF- κ B,抗菌肽及其他免疫基因的表达因此得以调控^[23]。

抗菌肽在虾类先天免疫系统中发挥着重要作用,不仅可以抵御外来病原入侵还可以排解自身的代谢产物。在甲壳动物中,目前报道的抗菌肽主要有 4 类:对虾素(Penaeidin)、甲壳素(Crustin)、抗脂多糖因子(ALF)以及溶菌酶(Lysozyme),这些抗菌肽都具有广谱杀菌活性。有研究报道 TLR 是在识别入侵细菌的分子模式后,通过激活抗菌肽的表达来调节虾的先天免疫。PAN 等^[24]研究发现在副溶血弧菌的刺激下对日本沼虾 *MnToll1* 进行沉默,*ALF2*、*Crustin1* 和 *Crustin2* 的表达量因此被抑制;WANG 等^[25]发现凡纳滨对虾 *LeToll2* 基因可以显著激活 NF- κ B 通路的抗菌肽基因;WANG 等^[13]发现在鳗弧菌的刺激下同时沉默克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) *PcToll* 基因,*Crustin*、*ALF* 和溶菌酶的表达被显著抑制;CHEN 等^[22]发现沉默拟穴青蟹 *SpToll1* 和 *SpToll2* 都可以抑制 *ALF5* 的表达,而 *ALF3* 只在沉默 *SpToll2* 后出现表达抑制。本实验中在 *MrTLR1* 被沉默之后 *ALF* 以及 *Crustin* 的表达量出现了显著下降,同时 *MrTLR2* 的表达量也出现了上升;在 *MrTLR2* 沉默实验中 *Crustin* 的表达量出现了显著下降,*ALF* 的表达量没有显著变化;而在 *MrTLR3* 沉默实验中 *ALF* 的表达量显著上升,*Crustin* 的表达量没有显著变化。在 *MrTLR1* 和 *MrTLR2* 的沉默实验中,*Crustin* 的表达量均出现了显著下降,前者 *Crustin* 表达量在注射后 48 h 表达量达到最低水平,为 0 h 的 43%,后者在 24 h 表达量达到最低水平,为 0 h 表达量的 33%。可以推测 *MrTLR1* 和 *MrTLR2* 都可调控罗氏沼虾抗菌肽的表达,而沉默 *MrTLR1* 后抑制了部分抗菌肽的表达,例如本实验中 *Crustin* 基因,这部分抗菌肽同时受到 *MrTLR2* 的调控影响且 *MrTLR2* 的影响作用大于 *MrTLR1*,机体为了维持体内抗菌肽的正

常水平从而增加 *MrTLR2* 的表达量。此外,在 *MrTLR1* 沉默实验中,*ALF* 的表达量显著下降,而在 *MrTLR3* 沉默实验中,*ALF* 的表达量出现显著上升,这可能与沉默 *MrTLR3* 后 *IMD* 的表达量出现上升有关。

IMD 信号通路是关键的 NF- κ B 信号通路之一,它参与调控抗菌肽的免疫应答。相关免疫基因的表达在 *IMD* 信号通路发生异常后会受到影响造成病原微生物入侵。LAN 等^[26]发现中国对虾和克氏原螯虾体内 *IMD* 信号通路参与抗菌肽的免疫调控;史晏如^[27]发现罗氏沼虾 *IMD* 基因参与对抗菌肽的表达调控。本实验中 *IMD* 表达上升后 *ALF* 的表达也出现了上升。HOU 等^[28]发现凡纳滨对虾 Toll 信号通路与 *IMD* 信号通路存在关联,在抑制凡纳滨对虾 *LvToll* 的表达后,*LvIMD* 的表达出现了抑制,抑制 *LvIMD* 的表达同样会抑制 *LvToll* 的表达。在 LIU 等^[29]的研究中,在凡纳滨对虾体内沉默 *Toll* 或 *IMD* 都会促使另一个基因的表达出现上调,发现 Toll 信号通路与 *IMD* 信号通路之间存在平衡调控。本实验中沉默 *MrTLR1* 和 *MrTLR2* 对 *IMD* 的表达量没有显著影响,而沉默 *MrTLR3* 时,*IMD* 的表达量显著上升。由此可以推测罗氏沼虾体内 Toll 信号通路与 *IMD* 信号通路之间存在关联,即当 Toll 信号通路受到影响时机会上调 *IMD* 基因的表达量来调控免疫平衡,而 *MrTLR3* 在其中发挥重要作用。

酚氧化酶原系统作为一种异己认知先天性免疫系统,在无脊椎动物的免疫防御中发挥重要作用^[30]。酚氧化酶原基因 *proPO* 是酚氧化酶系统中的上游关键基因。酚氧化酶原只有在酚氧化酶原激活酶的刺激下才可以形成具有活性的酚氧化酶,从而抵御病原。本研究中,沉默罗氏沼虾 3 种 *MrTLRs* 基因对虾体内 *proPO* 的表达没有显著影响。但有研究报道称在昆虫体内酚氧化酶原系统与 Toll 信号通路之间存在关联。在黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) 体内 β -1,3-葡聚糖依赖性酚氧化酶原系统和 Toll 信号通路共享 3 种酶:模块化丝氨酸蛋白酶、Spätzle 加工酶激活酶和 Spätzle 加工酶,其中 Spätzle 加工酶被发现是可同时影响两种免疫系统的末端蛋白酶,降解 *proPO* 前体以及 pro-Spätzle 影响黑色素和抗菌肽的产生^[31]。在烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 体内的血淋巴蛋白酶 6 通过对 pro-PAP1 的作用参与 *proPO*

的激活,此外还通过血淋巴蛋白酶 8 的水解过程进行裂解并激活 pro-Spätzle 影响 Toll 信号通路^[32]。根据本实验结果可以推测,罗氏沼虾 3 种 TLRs 与酚氧化酶原系统之间没有直接的相互调控作用,但可能存在间接的调控关系,仍需进一步研究。

目前在虾类中只有凡纳滨对虾和罗氏沼虾报道有 3 种 *TLRs*。有研究^[33-34]发现在关于凡纳滨对虾 TLR 的报道中,*LvToll1* 主要参与病毒引起的免疫反应,*LvToll2* 主要参与抵御细菌的免疫反应,而 *LvToll3* 可能对 dsRNA 病毒作出免疫反应。刘伟利等^[35]认为罗氏沼虾 *MrTLR1* 基因是鳃组织抵御细菌感染的主要应答基因,*MrTLR2* 基因可能参与鳃组织的其他免疫活动,*MrTLR3* 基因的调控机制尚未清晰。实验结果表明:罗氏沼虾 *MrTLR1* 和 *MrTLR2* 都参与了 *MyD88* 的表达调控,并且 *MrTLR1* 对 *MyD88* 的调控影响更显著,同时沉默 *MrTLR3* 对 *MyD88* 的表达没有显著影响;另外 *MrTLR1* 和 *MrTLR2* 都可以调控抗菌肽基因的表达,并且 *MrTLR1* 与 *MrTLR2* 之间可能存在某种平衡机制来维持机体免疫系统的正常运作;除此之外,*MrTLR3* 可能参与 Toll 信号通路和 *IMD* 信号通路之间的调控。

参考文献:

- [1] 周俊名,戴习林,蒋飞,等. 池养罗氏沼虾生长缓慢原因初步分析[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(6): 853-861.
- [2] ZHOU J M, DAI X L, JIANG F, et al. The preliminary analysis of the reasons for the poor growth of *Macrobrachium rosenbergii* in pond [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(6): 853-861.
- [3] LI F H, XIANG J H. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(4): 973-980.
- [4] O' NEILL L A J, GOLENBOCK D, BOWIE A G. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2013, 13(6): 453-460.
- [5] BEUTLER B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling [J]. Nature, 2004, 430 (6996): 257-263.
- [6] NÜSLEIN-VOLHARD C, LOHS-SCHARDIN M, SANDER K, et al. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila* [J]. Nature, 1980, 283(5746): 474-476.
- [7] ANDERSON K V, BOKLA L, NÜSLEIN-VOLHARD C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila*

- embryo: the induction of polarity by the *Toll* gene product [J]. *Cell*, 1985, 42(3): 791-798.
- [7] ELDON E, KOOYER S, D'EVELYN D, et al. The *Drosophila* *18 wheeler* is required for morphogenesis and has striking similarities to *Toll*[J]. *Development*, 1994, 120(4): 885-899.
- [8] YAGI Y, NISHIDA Y, IP Y T. Functional analysis of *Toll*-related genes in *Drosophila* [J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2010, 52(9): 771-783.
- [9] OOI J Y, YAGI Y, HU X D, et al. The *Drosophila* Toll-9 activates a constitutive antimicrobial defense [J]. *EMBO Reports*, 2002, 3(1): 82-87.
- [10] YANG L S, YIN Z X, LIAO J X, et al. A Toll receptor in shrimp[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(8): 1999-2008.
- [11] 刘文静. 斑节对虾 *TLR22* 及 *Relish* 基因的克隆与表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
LIU W J. Cloning and expression analysis of *TLR22* & *Relish* genes in *Penaeus monodon*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [12] YANG C J, ZHANG J Q, LI F H, et al. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 564-574.
- [13] WANG Z, CHEN Y H, DAI Y J, et al. A novel vertebrates Toll-like receptor counterpart regulating the anti-microbial peptides expression in the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 219-229.
- [14] MEKATA T, KONO T, YOSHIDA T, et al. Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 122-133.
- [15] SRISUK C, LONGYANT S, SENAPIN S, et al. Molecular cloning and characterization of a Toll receptor gene from *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(2): 552-562.
- [16] 赵炜, 陆娣, 赵树进. RNAi 研究进展 [C]//2014 年广东省药师周大会论文集. 广州: 广东省药学会, 2014.
ZHAO W, LU D, ZHAO S J. Research progress of RNAi [C]//Essays of 2014 Guangdong Pharmacist Week Conference. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical Association, 2014.
- [17] TAN K, LI Y H, ZHOU M, et al. siRNA knockdown of *MrlR* induces sex reversal in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Aquaculture*, 2020, 523: 735172.
- [18] FENG J L, ZHAO L L, JIN M, et al. Toll receptor response to white spot syndrome virus challenge in giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 57: 148-159.
- [19] 江丰伟, 傅洪拓, 乔慧, 等. 青虾 *Transformer-2* 基因 RNA 干扰规律的研究[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(32): 32-37.
- JIANG F W, FU H T, QIAO H, et al. The RNA interference regularity of *Transformer-2* gene of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(32): 32-37.
- [20] 田宏刚, 刘同先, 张文庆. RNAi 技术在中国昆虫学研究中的发展、应用与展望[J]. *应用昆虫学报*, 2019, 56(4): 605-616.
- TIAN H G, LIU T X, ZHANG W Q. Progress in RNAi technology, and prospects for its application, in entomological research in China [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56(4): 605-616.
- [21] DEEPIKA A, SREEDHARAN K, PARIJA A, et al. Toll-pathway in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) responds to white spot syndrome virus infection: evidence through molecular characterisation and expression profiles of *MyD88*, *TRAF6* and *TLR* genes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 441-454.
- [22] CHEN Y, AWEYA J J, SUN W W, et al. *SpToll1* and *SpToll2* modulate the expression of antimicrobial peptides in *Scylla paramamosain* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 87: 124-136.
- [23] WEST A P, KOBLANSKY A A, GHOSH S. Recognition and signaling by toll-like receptors[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22: 409-437.
- [24] PAN X T, LI T T, YANG C H, et al. A toll receptor is involved in antibacterial defense in the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 583-589.
- [25] WANG P H, LIANG J P, GU Z H, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (*LvToll2* and *LvToll3*) and three putative Spätzle-like Toll ligands (*LvSpz1-3*) from *Litopenaeus vannamei* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 36(2): 359-371.
- [26] LAN J F, ZHOU J, ZHANG X W, et al. Characterization of an immune deficiency homolog (IMD) in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 608-617.
- [27] 史晏如. 罗氏沼虾 IMD 信号通路关键基因 (*Relish*、*IMD*) 的克隆和功能研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2016.
SHI Y R. Cloning and functional study of key genes (*Relish*, *IMD*) of IMD signaling pathway in *Macrobrachium rosenbergii* [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2016.
- [28] HOU F J, HE S L, LIU Y J, et al. RNAi knock-down of shrimp *Litopenaeus vannamei* *Toll* gene and immune deficiency gene reveals their difference in regulating antimicrobial peptides transcription [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 44(2): 255-260.
- [29] LIU Y J, SONG L, SUN Y H, et al. Comparison of immune response in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after

- knock down of *Toll* and *IMD* gene in vivo[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 60: 41-52.
- [30] 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.
- [31] KAN H, KIM C H, KWON H M, et al. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(37): 25316-25323.
- [32] AN C J, JIANG H B, KANOST M R. Proteolytic activation and function of the cytokine Spätzle in the innate immune response of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*[J]. *FEBS Journal*, 2010, 277(1): 148-162.
- [33] GUANZON D A V, MANINGAS M B B. Functional elucidation of LvToll 3 receptor from *P. vannamei* through RNA interference and its potential role in the shrimp antiviral response [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 84: 172-180.
- [34] 李晶晶, 李云, 刘红, 等. 感染溶藻弧菌及白斑综合症病毒后凡纳滨对虾不同组织的 Toll 样受体基因表达变化研究[J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(2): 476-483.
- LI J J, LI Y, LIU H, et al. The expression of toll-like receptors in different tissues of *Litopenaeus vannamei* after challenges with white spot syndrome virus and *Vibrio alginolyticus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(2): 476-483.
- [35] 刘伟利, 刘红, 丁福江, 等. 罗氏沼虾 TLRs 基因表达差异分析[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(4): 721-727.
- LIU W L, LIU H, DING F J, et al. Differential expression of TLRs gene in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(4): 721-727.

Effects of RNA interferences with different Toll-like receptors on the expression of immune-related genes in *Macrobrachium rosenbergii*

YUAN Wei^{1,2,3}, DAI Xilin^{1,2,3}, GE-PAN yuanyuan¹, LI Yun^{1,2,3}, DING Fujiang⁴

(1. National Demonstration Center of Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Shanghai Shen Cao Special Aquatic Development Company, Shanghai 201516, China)

Abstract: RNA interference assays of three types of MrTLRs in *Macrobrachium rosenbergii* were conducted using specific short-interfering RNAs (siRNAs) with doses of 0.4, 0.8, and 1.2 $\mu\text{g/g}$, and the relative expression levels of three Toll-like receptor genes in gills were analyzed with relative quantitative real-time PCR. The result showed that 1.2 $\mu\text{g/g}$ was the optimal dose of siRNA for RNA interference assay of MrTLRs in the present study. In the RNA interference assay of MrTLR1, the expression of Myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*), *Crustin* and anti-lipopolysaccharide factor (*ALF*) in MrTLR1-silenced prawns obviously declined at 24 h and 48 h post injection, whereas the MrTLR2 expression was significantly upregulated. Furthermore, the expression levels of *MyD88* and *Crustin* significantly decreased in MrTLR2-silenced prawns, and the silencing of MrTLR3 induced remarkable upregulation of the expression of immune deficiency (*IMD*) and *ALF* in *M. rosenbergii*. Additionally, there was no significant difference of prophenoloxidase (*proPO*) expression between MrTLRs-silenced groups and scrambled-siRNA group. These results suggested that MrTLR1 and MrTLR2 might be involved in the regulation of antibacterial peptides expression, and MrTLR3 exhibited regulatory effects on the Toll signaling pathway as well as IMD signaling pathway in *M. rosenbergii*.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; siRNA; Toll-like receptor; RNA interference; immune-related gene