

欧江涛,蒋启程,周刻焱,等. 基于芯片筛选螺原体感染中华绒螯蟹血细胞的免疫 microRNAs[J]. 江苏农业科学,2022,50(17):46–52.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2022.17.008

基于芯片筛选螺原体感染中华绒螯蟹血细胞的免疫 microRNAs

欧江涛,蒋启程,周刻焱,柳 巧,栾筱琪,王资生,张启煊

(盐城工学院海洋与生物工程学院,江苏盐城 224051)

摘要:为筛选分析螺原体(*Spiroplasma eriocheiris*)感染中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血细胞免疫相关 microRNAs(miRNA)及其差异表达情况,利用微流体芯片技术,对正常和感染螺原体的中华绒螯蟹血细胞 miRNA 进行系统的鉴定与表达检测;结合生物信息学方法,分析其靶基因和免疫信号通路。利用前期研究和已有报道 897 条成熟 miRNA 作为探针订制单色芯片,使用 Cy3 染料标记,通过与中华绒螯蟹血细胞总 RNA 样本杂交,鉴定 miRNA,检测其表达情况;对差异表达的 miRNA 进行靶基因预测、功能聚类 and 通路分析;随机挑选部分差异表达的 miRNA 进行茎环 RT-qPCR 验证。结果显示,总共鉴定出中华绒螯蟹血细胞 miRNA 共 303 个;健康组和试验组共表达 miRNA 有 48 个;差异表达 miRNA 为 27 个,其靶基因共注释到 116 个 GO 和 63 个 KEGG 通路;通过茎环 RT-qPCR 检测,结果与芯片基本一致。研究发现,差异表达 miRNA 靶基因,许多均存在于重要免疫信号通路之中,研究结果可为进一步分析中华绒螯蟹血细胞螺原体感染中的 miRNA 与其靶基因间的免疫调控机制提供借鉴。

关键词:中华绒螯蟹;螺原体;microRNA;微流体芯片

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2022)17–0046–07

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,是我国特有的优质淡水虾蟹养殖品种之一,也是我国重要的水产经济蟹种,具有较高的营养价值。随着中华绒螯蟹水产养殖业的集约化大规模高速发展,导致水体环境状况急速恶化,病害频发且愈发严重。其中,由螺原体引起的“颤抖病”在中华绒螯蟹养殖

中发生较为广泛。中华绒螯蟹作为无脊椎动物主要依赖其先天免疫(包括细胞和体液免疫)发挥重要的免疫调控作用。目前,对于中华绒螯蟹细菌感染研究报道较多,相关研究发现,中华绒螯蟹应对副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)等细菌侵染的免疫反应中,整合素(EsIntegrin)、C 型凝集素(EsCTL1 和 EsCTL2)、L 型凝集素(ERIC-53 和 VIP36)等可作为识别受体参与宿主免疫防御^[1–2];其中,peritrophin-like gene、MyD88、Relish 等基因是重要的免疫调控因子^[3],发挥重要调节功能。而关于它的分子调控机制,至今仍是研究热点。

收稿日期:2021–08–27

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31872601)。

作者简介:欧江涛(1975—),男,贵州织金人,博士,副教授,主要从事动物生物技术研究,E-mail:ojt110@126.com;共同第一作者:蒋启程(1999—),男,江苏南京人,主要从事动物生物技术研究,E-mail:qicheng_jiang@163.com。

通信作者:王资生,博士,教授,主要从事生物生物技术研究。E-mail:wzs399@126.com。

[19] Prall W, Hendy O, Thornton L E. Utility of a phylogenetic perspective in structural analysis of CYP72A enzymes from flowering plants[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0163024.

[20] Napier R M, Fowke L C, Hawes C R, et al. Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum[J]. Journal of Cell Science, 1992, 102(2): 261–271.

[21] Hirose S, Kawahigashi H, Tagiri A, et al. Tissue-specific expression of rice CYP72A21 induced by auxins and herbicides[J]. Plant Biotechnology Reports, 2007, 1(1): 27–36.

[22] Bruce T, Matthes M C, Chamberlain K, et al. Cis-jasmone induces Arabidopsis genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2008, 105(12): 4553–4558.

[23] Liu Q, Khakimov B, Cárdenas P D, et al. The cytochrome P450 CYP72A52 is key to production of hederagenin-based saponins that mediate plant defense against herbivores[J]. New Phytologist, 2019, 222(3): 1599–1609.

[24] 张文婷. 玉米 ZmCYP72A5 基因的功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020: 44–48.

河蟹螺原体 (*Spiroplasma eriocheiris*) 属于柔膜体纲 (Mollicutes) 虫原体目 (Entomoplasmatales) 螺原体科 (Spiroplasmataceae) 螺原体属 (*Spiroplasma*)。螺原体是上世纪 70 年代被发现,可广泛寄生于无脊椎动物中具有严重致病性的一类独特微生物,其定植于宿主体内,在长期与宿主共存过程中,相互构成复杂网络,通过不同精细调控细菌基因表达,以适应不同的生存环境,并对不同宿主发挥毒性作用。螺原体为中华绒螯蟹的主要病原体之一,被感染后死亡率可达 100%,近年中华绒螯蟹螺原体致使中华绒螯蟹、南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 和克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 等甲壳经济动物暴发疫病发生大面积死亡,对我国水产经济动物养殖业造成巨大经济损失^[4-5]。中华绒螯蟹螺原体通过鳃或外壳感染河蟹,并在 1~5 d 内增殖于其靶细胞—血淋巴细胞,5~10 d 扩散至全身器官及结缔组织,最后在 10~15 d 引起中华绒螯蟹附肢颤抖直至死亡^[5]。

MicroRNA (miRNA) 是一类非编码 RNA 分子,广泛存在于真核细胞中,它通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区 (UTR) 碱基配对调节基因表达,其长度为 19~25 nt, miRNA 虽不能直接编码蛋白质,但 miRNA 在不同基因转录后的调控中具有重要作用^[6]。第一条 miRNA 被 Lee 等发现后,对于 miRNA 的研究引起了广泛关注,miRNA 在各种生命活动中起重要调控作用,如生长发育、生殖、免疫代谢等^[7-8]。目前,miRNA 研究方法主要有基因芯片、RNA-seq、Northern blotting 和茎环 qRT-PCR 等。其中,微流体芯片高通量可靠检测 miRNAs 的存在和差异表达情况,在水产养殖动物研究中已广泛应用^[9-11]。

当前,利用微流体芯片技术系统鉴定与分析中华绒螯蟹螺原体感染血细胞的 miRNA 及其表达情况,至今仍未见报道。前期,笔者所在实验室以正常和感染螺原体中华绒螯蟹血细胞为研究对象,进行 miRNA 转录组测序分析,初步预测了血细胞免疫相关的 miRNA^[12]。本研究在前期基础上,通过构建中华绒螯蟹 miRNA 的特异微流体芯片,进一步系统鉴定血细胞免疫相关 miRNA 并检测其表达情况,对差异表达的 microRNA 进行靶基因预测和功能聚类与通路分析,相关研究结果将为中华绒螯蟹该疫病的免疫防控和抗病育种提供分子信息。

1 材料与方法

1.1 螺原体感染中华绒螯蟹血细胞的样品准备

中华绒螯蟹购于江苏省南京市某养殖户, (100±10) g 共 100 只,在试验前放置于 10 L 带有循环水、紫外灭菌、充氧及控温系统 (26~28 ℃) 中培育,通过 PCR 技术及负染技术证实研究所用中华绒螯蟹为螺原体阴性。试验所用螺原体分离自患螺原体病的中华绒螯蟹^[13],R2 培养基中培育 48 h 备用。

2012 年 6 月在南京师范大学将中华绒螯蟹分为对照组和试验组,各 50 只,培养 20 d 备用;对照组注射 100 μL R2 培养基,试验组注射 100 μL 含螺原体 (培养至对数期) R2 培养基。饲养温度保持 28 ℃,间歇性供氧。抽取血液,采用 Trizol 提取法从血细胞中提取 RNA,并对 RNA 进行质量检测。

1.2 中华绒螯蟹微流体芯片构建及差异表达检测

由表 1 可知,基于 miRBase 中收录的中华绒螯蟹、淡水枝角水蚤 (*Daphnia pulex*)、日本对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 4 种动物共 897 条成熟 miRNA 序列作为本研究探针。采用 Cy3 染料标记 RNA 样品,可通过检测分析 Cy3 的荧光强度来寻找 2 组样品差异表达的 miRNAs。

在总 RNA 质检通过后,进入芯片试验阶段,由 LC Science 参与完成。使用 Array-Pro 图像分析软件进行图像数字化转换。首先,减除背景值,再使用 LOWESS 过滤进行信号归一化。衡量杂交结果可靠性的标准如下: (1) CV 值 < 0.5; (2) 探针信号值大于 3 倍背景值与标准偏差的和。满足以上 2 点为表达检测结果为阳性。

表 1 中华绒螯蟹微流体芯片探针

动物	探针编号	探针数 (条)
中华绒螯蟹 (<i>Eriocheir sinensis</i>)	esi-miR	713 ^[12]
淡水枝角水蚤 (<i>Daphnia pulex</i>)	dpu-miR	15 ^[14]
日本对虾 (<i>Marsupenaeus japonicus</i>)	mja-miR	23 ^[15]
克氏原螯虾 (<i>Procambarus clarkii</i>)	pcl-miR	146 ^[16]

1.3 差异 miRNA 靶基因预测及其 GO 和 KEGG 功能富集分析

通过微流体芯片检测,可获得正常和感染螺原体中华绒螯蟹共同表达 miRNA 及两者差异表达 miRNA。为了解 2 组中华绒螯蟹差异 miRNA 功能,选用分析软件“miRanda, PITA 和 TargetScan”进行

预测差异显著 miRNA 的所有靶基因,结合三者预测结果,取交集,获取共有靶基因。根据 Gene Ontology 数据库对靶基因进行功能分析,根据 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库对靶基因进行 Pathway 分类,而得到 Path way 分类。

1.4 茎环 RT-qPCR 验证

设计茎环引物,进行反转录、RT-qPCR 试验,

反转录反应 PCR 程序为:42 ℃ 60 min,70 ℃ 15 min。RT-qPCR 程序为:50 ℃ 2 min 95 ℃ 2 min;95 ℃ 15 s 60 ℃ 15 s,39 次循环。每个样品均为 3 复孔, β -actin 为内参基因,miRNA 差异表达水平用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算。采用 Primer 5.0 (ABI) 进行引物设计,采用特异性引物进行反转录,共设计 9 对引物,引物序列见表 2。

表 2 miRNA 的引物序列

miRNA	序列(5'→3')	引物序列(5'→3')
PC-esi-137-3p	TTGGCAGGAAATCGATCAGA	RT 引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCTGAT; 正向引物:GCCGCCTTGGCAGGAAAT;反向引物:CACTGCAGGGTCCGAGGTAT
PC-esi-14-5p	ACTGCTGTACTGTTGTT	RT 引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACAAC; 正向引物:GGAGCGTGACTGCTGTACTGT;反向引物:GGCAGGGTCCGAGGTATTC
PC-esi-140-5p	TTGTACCTGCAATGAGT	RT 引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACTCAT; 正向引物:CAGCGTGTTGTACCTGCAAT;反向引物:AGCAGGGTCCGAGGTATTC
PC-esi-229-3p	ATTGATGGGGCTTTTA	RT 引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTAAAG; 正向引物:ACAGCGTGATTGATGGGGC;反向引物:CGCAGGGTCCGAGGTATTC
PC-esi-262-3p	GTAGTGGGAGTAGGAGCTGCA	RT 引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGCAGC; 正向引物:ACCGCTGTAGTGGGAGTAGGAG;反向引物:CGCAGGGTCCGAGGTATTC
PC-esi-33-3p	CAACCTATATGTGAGCAAA	RT 引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTTGCT; 正向引物:GCCGAGCAACCTATATGTGA;反向引物:AGCAGGGTCCGAGGTATTC
PC-esi-394-5p	CACTGACCATGGCAAGA	RT 引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCTTGC; 正向引物:CAGCGTGCAGTACCATG;反向引物:AGCAGGGTCCGAGGTATTC
PC-esi-433-5p	TCAGGTAGTGTGTCCAT	RT 引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATGGAC; 正向引物:CATCCGCTTCAGGTAGTGTGTC;反向引物:CGCAGGGTCCGAGGTATTC
PC-esi-69-3p	GCAGCAGTGCGTGGGGC	RT 引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCCCA; 正向引物:GCAGCGTGGCAGCAGTG;反向引物:CGCAGGGTCCGAGGTATTC

2 结果与分析

2.1 中华绒螯蟹血细胞 miRNA 的芯片鉴定与表达分析

试验组和对照组各使用 3 张芯片进行检测,每张芯片都设计多重质控探针,保证了样品标记和杂交试验的质量控制。对于正常和感染中华绒螯蟹血细胞中不同 miRNA,根据芯片所产生的不同反应信号,通过分析这些芯片杂交信号值,选取 Signal > 200 及 $P < 0.05$ 为分析基准,数据进行归一化处理后进行 t -Test 和 Cluster 分析。由图 1 可知,6 张芯片总共鉴定出中华绒螯蟹血细胞 miRNA 为 303 个,试验组和对照组共表达 miRNA 有 48 个,其中,有 27 个表达 miRNA 差异显著 ($P < 0.05$),6 个表达 miRNA 差异极显著 ($P < 0.01$);在这些差异表达的 miRNA 中,12 个 miRNA 显著下调,15 个 miRNA 显著上调 ($P < 0.05$)。

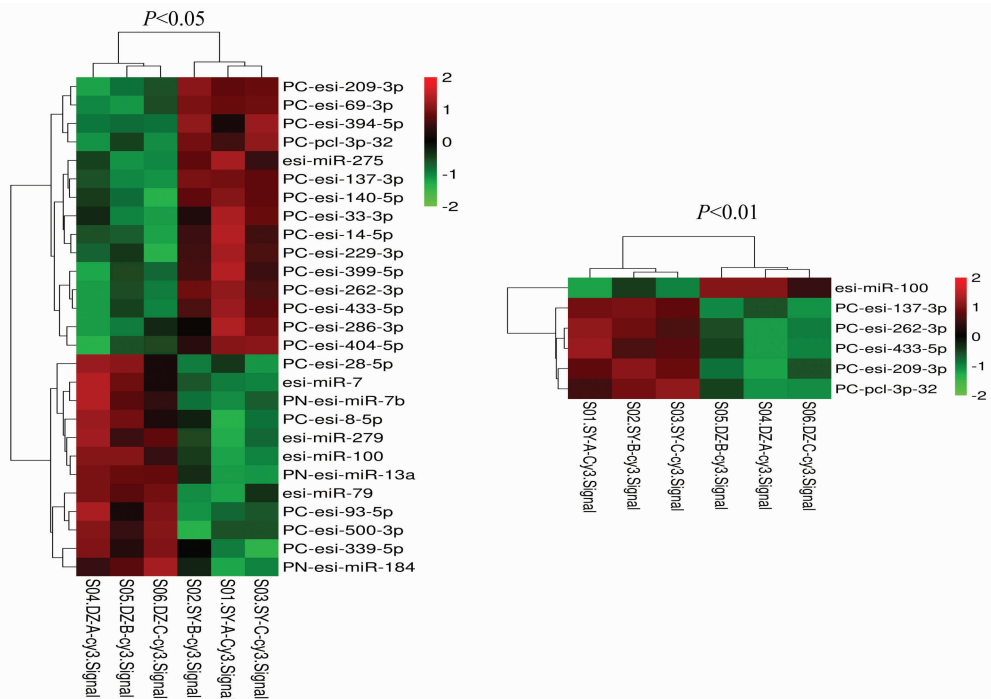
2.2 差异 miRNA 的靶基因预测、GO 注释和 Pathway 分类

由表 3 可知,通过利用 3 款分析软件“miRanda、PITA 和 TargetScan”对差异显著的 27 个 miRNA 靶基因进行预测,结合三者数据取交集,共得 78 个靶基因,预测靶基因大多数为各种蛋白和酶的基因,参与调节各种生命活动,尤其是在免疫调节中发挥作用的 proPO、ALF-2、Peroxinectin、Relish 免疫因子等。

由图 2-A 可知,对预测到的 78 个靶基因进行 GO 注释,共有 116 个 GO 通路被注释,明显富集于 24 个 GO,包括:蛋白水解、cAMP 生物合成和钙离子结合等;由图 2-B 可知,通过 KEGG 注释,发现 63 个通路被注释,14 个主要通路,包括:嘌呤代谢、趋化因子信号通路和 GnRH 信号通路等。

2.3 茎环 RT-qPCR 试验结果

为验证微流体芯片的检测结果,由图 3 可知,随

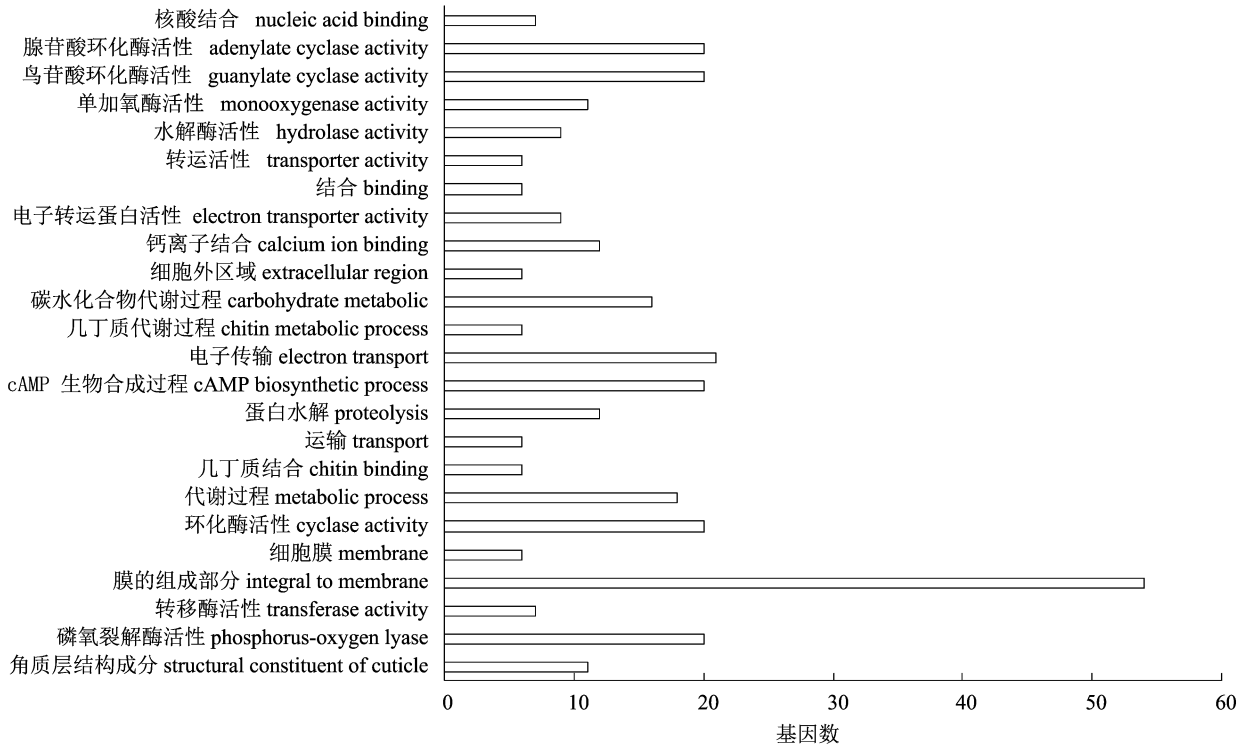


热图显示了对照组与试验组共表达差异显著的 27 个 miRNA(左图, $P<0.05$)和 6 个差异极显著的 miRNA(右图, $P<0.01$) 差异表达情况;其中 DZ 为对照组,SY 为试验组,红色代表 miRNAs 上调,绿色代表 miRNA 下调

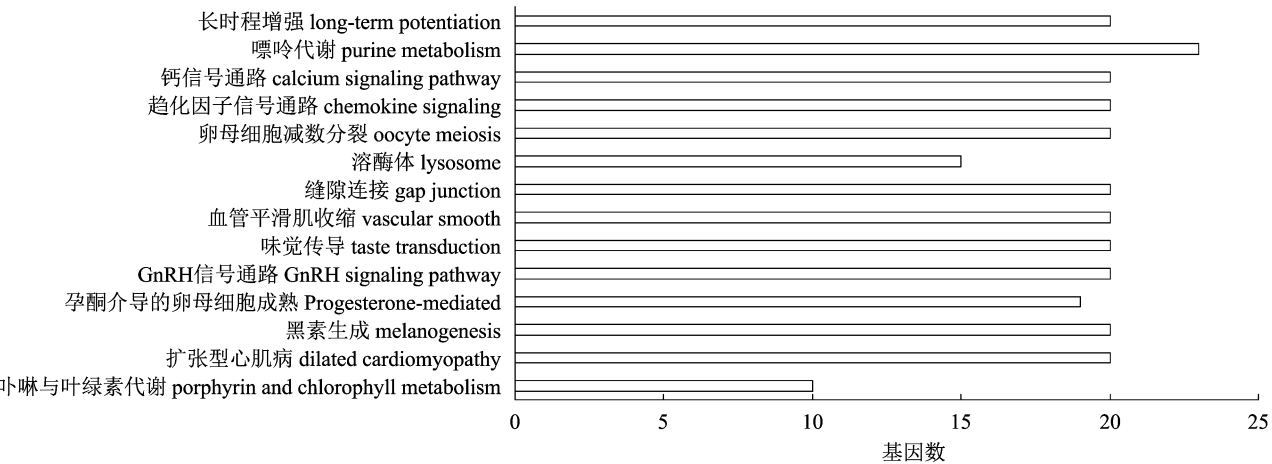
图1 差异表达 miRNA 的芯片分析热图

表 3 miRNA 的预测靶基因

miRNA	microRNA 预测靶基因
esi - miR - 100	Peroxinectin
esi - miR - 275	SUMO - conjugating enzyme(UBC9),predicted ANK - like protein,myosin Va,cathepsin L
esi - miR - 279	selenoprotein M(SelM),predicted ANK - like protein,molt - inhibiting hormone(MIH)
esi - miR - 79	ubiquitin C,prohibitin,polyubiquitin,peroxiredoxin 6 (PRX6),ovarian cyclin B,glutathione peroxidase(GPx),clip domain serine protease(cSP),acyl - CoA delta - 9 desaturase
PC - esi - 137 - 3p	relish,glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase,acyl - CoA delta - 9 desaturase
PC - esi - 140 - 5p	strain IOCAS myosin essential light chain,relish
PC - esi - 14 - 5p	serpin,predicted ANK - like protein,PDGF/VEGF - related factor 1,catalase,anti - lipopolysaccharide factor 3 (ALF - 3)
PC - esi - 229 - 3p	ubiquitin/ribosomal L40 fusion protein,ubiquitin b,Rab - 3,prophenoloxdiase(proPO)
PC - esi - 262 - 3p	ubiquitin conjugating enzyme - 3,myosin Va,leptin receptor protein(LEPR)
PC - esi - 28 - 5p	relish
PC - esi - 286 - 3p	myosin Va
PC - esi - 33 - 3p	prohibitin,cathepsin A,catalase
PC - esi - 339 - 5p	ovarian cyclin B,leptin receptor protein(LEPR),glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase
PC - esi - 394 - 5p	ovarian cyclin B
PC - esi - 399 - 5p	SIBD,farnesoic acid O - methyltransferase(FAMEt)
PC - esi - 404 - 5p	myostatin
PC - esi - 500 - 3p	serpin,prophenoloxdiase (proPO),ovary development - related protein(EJO3),metallothionein - 1 (MT - 1),MAP kinase,cathepsin L,anti - lipopolysaccharide factor
PC - esi - 69 - 3p	ovarian cyclin B,leptin receptor protein (LEPR),glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase
PC - esi - 93 - 5p	serpin,relish,cystatin,astakine,anti - lipopolysaccharide factor 2(ALF - 2)
PN - esi - miR - 13a	predicted ANK - like protein,peroxiredoxin 6 (PRX6), ovarian cyclin B, myostatin,metallothionein - 1 (MT - 1), glutathione peroxidase(GPx),cytokine signaling 2
PN - esi - miR - 7b	ubiquitin/ribosomal S27 fusion protein 2, strain IOCAS myosin essential light chain,relish,prophenoloxdiase(proPO), ovarian cyclin B,metallothionein - 1(MT - 1),isolate PCNA - EJS PCNA



A. 24 个 GO 功能富集



B. 14 条途径

图2 差异表达 miRNA 的 GO 和 KEGG 分析

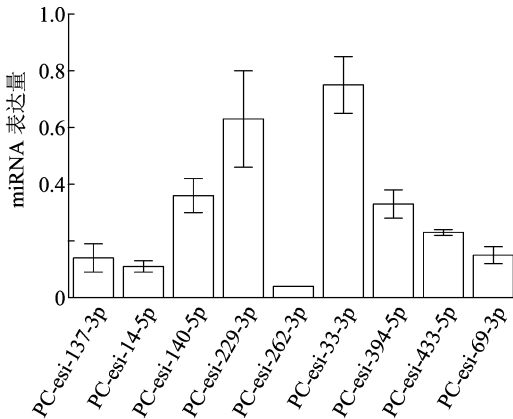


图3 RT-qPCR 的验证结果

机选取 PC - esi - 137 - 3p、PC - esi - 14 - 5p、PC - esi - 140 - 5p、PC - esi - 229 - 3p、PC - esi - 262 - 3p、PC - esi - 33 - 3p、PC - esi - 394 - 5p、PC - esi - 433 - 5p、PC - esi - 69 - 3p 这 9 个明显差异表达的 miRNA 进行验证,利用茎环 RT - qPCR 法检测 miRNA 的差异表达情况。结果表明,这 9 个 miRNA 表达水平平均上调,与微流体芯片结果一致。

3 讨论

miRNA 通过与靶标基因的 3' - 非翻译区 (3' - UTR) 互补,抑制 mRNA 表达或直接裂解 mRNA,调

控各种生理和病理作用。miRNA 也是至今研究最广泛的一类非编码 RNA,已被证明在调节先天性和适应性免疫系统中发挥重要作用^[17]。因此,鉴定和筛选免疫相关的 miRNA,解析其在宿主与病原体中的相互关系,将在疾病防控和抗病育种中发挥重要作用。在 miRNA 研究中,微流体芯片技术已被广泛应用,微流体芯片技术是高通量、特异性和敏感性强的基因鉴定和差异检测方法,在动物的生长、发育和免疫应答等方面运用较多。李升等选用不同月龄香猪的肝脏组织 RNA,与微流体芯片杂交,结果表明不同月龄肝脏 miRNA 的表达水平存在差异^[18]。关于水产动物研究,何耀东等利用微流体芯片技术研究发现,在注射自噬诱导剂后对虾血淋巴中有 15 个 miRNA 明显上调,17 个 miRNA 明显下调,表明相关差异表达 miRNA 在白斑综合症病毒(WSSV)感染对虾的过程中发挥作用^[19]。现今,微流体芯片技术,因其具有微量化、快速、高通量等特点,近年来已被广泛应用到癌症、微生物和营养等多个领域研究中^[20-22]。随着微流体芯片的进一步广泛应用,将极大促进功能性调控 miRNA 的发现与鉴定,为进一步研究免疫调控机制奠定基础。

中华绒螯蟹属于无脊椎动物,完全依赖先天免疫(包括细胞和体液免疫),而缺乏适应性免疫来抵御细菌和病毒等。甲壳动物血细胞是主要的免疫细胞,在宿主的先天免疫活动中起着至关重要的作用,包括识别、吞噬、黑化、细胞毒性和细胞间信号传递等。因此,识别和鉴定参与先天免疫应答的调节因子(如非编码 RNA 和转录因子)至关重要。前期研究通过对正常和感染螺原体的血细胞进行高通量测序分析,结合生物信息学分析,共鉴定出 735 个 miRNA;在被螺原体感染后,本研究发现 228 个 miRNA 表达量存在明显差异,133 个 miRNA 显著上调,95 个 miRNA 显著下调^[12]。在此基础上,本研究选择微流体芯片和茎环 RT-qPCR 技术,对细胞免疫相关 miRNAs 进行了进一步的筛选鉴定与验证。由于 μ ParaFlo[®] 微流体芯片相比于传统点样芯片具有更可靠、准确和灵活特点,本研究利用该技术鉴定出中华绒螯蟹血细胞 miRNA 共 303 个;健康组和试验组共表达 miRNA 有 48 个,其中,差异显著 miRNA 为 27 个(占比 56.25%);差异极显著 miRNA 为 6 个(占比 12.50%)。随机选择 9 个差异表达 miRNA 进行茎环 RT-qPCR 验证,结果与芯片结果一致,说明芯片检测结果准确可靠。

近年,随着测序成本的下降和技术的不断发展,miRNA 在虾蟹免疫调控中发挥作用的研究已较为广泛。Ou 等研究发现,pc1-miR-34、pc1-miR-7、PN-pc1-let-7、pc1-miR-1 和 pc1-miR-2b 在克氏原螯蟹应对螺原体感染过程中发挥着积极作用,且在脊椎动物和无脊椎动物中高度保守^[16]。Bao 等研究发现,miR-589-5p 在凡纳滨对虾可调节抗 WSSV 免疫应答中血蓝蛋白的表达^[23]。Soo 等发现,bta-miR-4286、dre-miR-107b 在斑节对虾(*Penaeus monodon*)应对副溶血弧菌感染过程中与对肌蛋白基因表达、钙浓度有调控作用^[24]。本研究通过利用 3 款分析软件“miRanda、PITA 和 TargetScan”对差异显著的 27 个 miRNA 进行靶基因预测,取三者交集,共得到 78 个靶基因,涉及多个重要免疫通路,其中,prophenoloxdiase (proPO)、clip domain serine protease (cSP)、Relish 和 MAP kinase 等多个靶基因是参与免疫调控的重要免疫因子。

酚氧化酶(proPO)系统是无脊椎动物先天免疫的重要组成部分之一,过氧化物酶可与 proPO 相关的细胞黏附因子相互作用来进行免疫调节^[25]。免疫缺陷同系物(immune deficiency homolog,IMD)信号通路是调节甲壳动物固有免疫的主要信号传导途径,而 Relish 是 IMD 信号通路中的关键因子,Bai 等发现,Relish 参与了中华绒螯蟹对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的免疫防御过程^[3];Zhang 等发现,Relish 在克氏原螯蟹中能诱导 AMP 基因的表达^[26];丝裂原激活的蛋白激酶途径(MAPK)能够通过调节胞内蛋白来发挥调控功能,如细胞分化、凋亡、增殖和免疫反应^[27]。笔者所在课题组前期运用 RNA-seq 测序技术,结合本研究的微流体芯片技术,全面分析了正常和感染螺原体的中华绒螯蟹血细胞 mRNA 和 miRNA 转录组。结果显示,许多免疫相关 miRNA 及其靶基因均表达显著差异。它们参与了一些典型免疫相关途径,包括补体和凝血级联途径、VEGF 信号途径、Wnt 信号途径、NK 细胞介导的细胞毒性、MAPK 信号途径、神经活性配体-受体相互作用途径和溶酶体途径^[12,28]。

本研究同时通过对差异表达 miRNA 的靶基因进行了 GO 和 KEGG 功能分析,共注释到 116 个 GO 通路和 63 个 KEGG 通路,主要集中于宿主的多种酶活性、代谢和免疫通路等,包括细胞免疫涉及的包裹、结节形成和吞噬作用,与体液免疫涉及的酚氧化酶激活系统(proPO 系统)、凝血级联和抗菌肽

(AMP)的合成等。以上研究结果可为进一步深入研究中华绒螯蟹免疫机制提供科学理论依据,为水产经济动物虾蟹该疫病的综合防控奠定基础。

参考文献:

- [1] Huang Y, An L, Hui K M, et al. An LDLa domain – containing C – type lectin is involved in the innate immunity of *Eriocheir sinensis* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 42 (2) : 333 – 344.
- [2] Huang Y, Zhao L L, Feng J L, et al. A novel integrin function in innate immunity from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 52 (2) : 155 – 165.
- [3] Bai L W, Zhou K M, Li H, et al. Bacteria – induced IMD – Relish – AMPs pathway activation in Chinese mitten crab [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106 : 866 – 875.
- [4] 王 文. 虾蟹新型病原螺原体的发现和研究 [J]. 南京师大学报 (自然科学版), 2016, 39 (1) : 1 – 13.
- [5] 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 (Pt 9) : 3035 – 3040.
- [6] 曹 访, 刘 莉, 采克俊, 等. 五月龄翘嘴红鲌性腺组织小 RNA 转录谱的分析比较 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48 (2) : 77 – 82.
- [7] 王 博, 田园园, 孙成飞, 等. 翘嘴鲌 microRNA 转录组分析及生长相关 miRNA 鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36 (2) : 603 – 613.
- [8] 郭 梁, 蒋启程, 崇加俊, 等. 水产虾蟹 microRNA 组学研究进展 [J]. 生物资源, 2020, 42 (1) : 67 – 76.
- [9] Chung S H, Baek C, Cong V T, et al. The microfluidic chip module for the detection of murine *Norovirus* in oysters using charge switchable micro – bead beating [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 67 : 625 – 633.
- [10] Li Y B, Yang X J, Chen Z G, et al. Comparative toxicity of lead (Pb^{2+}), copper (Cu^{2+}), and mixtures of lead and copper to zebrafish embryos on a microfluidic chip [J]. *Biomicrofluidics*, 2015, 9 (2) : 024105.
- [11] Ukleja – Sokółowska N, Gawrońska – Ukleja E, Lis K, et al. Analysis of the allergen profile of patients sensitized to shrimp based on ImmunoCAP immune solid – phase allergen chip results [J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2020, 125 (3) : 355 – 357.
- [12] Ou J T, Meng Q G, Li Y, et al. Identification and comparative analysis of the *Eriocheir sinensis* microRNA transcriptome response to *Spiroplasma eriocheiris* infection using a deep sequencing approach [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32 (2) : 345 – 352.
- [13] Wang W, Gu W, Gasparich G E, et al. *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., associated with mortality in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61 (4) : 703 – 708.
- [14] Colbourne J K, Pfrender M E, Gilbert D, et al. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex* [J]. *Science*, 2011, 331 (6017) : 555 – 561.
- [15] Ruan L W, Bian X F, Ji Y C, et al. Isolation and identification of novel microRNAs from *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31 (2) : 334 – 340.
- [16] Ou J T, Li Y, Ding Z F, et al. Transcriptome – wide identification and characterization of the *Procambarus clarkii* microRNAs potentially related to immunity against *Spiroplasma eriocheiris* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35 (2) : 607 – 617.
- [17] O'Connell R M, Rao D S, Chaudhuri A A, et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10 (2) : 111 – 122.
- [18] 李 升, 许亚楠, 牛 熙, 等. 利用 miRNA 芯片筛选不同月龄香猪肝脏中差异表达的 miRNA [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44 (3) : 673 – 678.
- [19] 何耀东. 对虾 miR – 71 介导的自噬及白斑综合症病毒 (WSSV) 编码的 miRNA 在病毒感染中的作用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [20] 赵雨杰, 钟连声, 何 群, 等. 生物芯片在微生物学研究中的应用 [J]. 微生物学杂志, 2016, 36 (1) : 1 – 5.
- [21] 于 敏. 基于微流控芯片的肺癌间质表型高转移亚系的筛选及 EMT 相关 miRNA 的鉴定与功能验证 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [22] 张春红. 人体微量营养素缺乏风险关联 SNP 高通量微流体芯片方法研究与初步应用 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2019: 31 – 46.
- [23] Bao S Y, Zheng Z H, Aweya J J, et al. microRNA – 589 – 5p modulates the expression of hemocyanin as part of the anti – WSSV immune response in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 107 : 103642.
- [24] Soo T C C, See S A, Bhassu S. Potential muscle activity disturbance in *Penaeus monodon* during Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) infection: inference through gene expression, calcium concentration, and microRNA [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2020, 177 : 107497.
- [25] Qi C L, Wang X D, Han F L, et al. Arginine supplementation improves growth, antioxidant capacity, immunity and disease resistance of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93 : 463 – 473.
- [26] Zhang H W, Xie G H, Ren X H, et al. Bursicon homodimers induce the innate immunity via Relish in *Procambarus clarkii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 99 : 555 – 561.
- [27] Patel B, Banerjee R, Basu M, et al. Toll like receptor induces Ig synthesis in *Catla catla* by activating MAPK and NF – κ B signalling [J]. *Molecular Immunology*, 2019, 105 : 62 – 75.
- [28] Wang Y H, Xiu Y J, Bi K R, et al. Integrated analysis of mRNA – seq in the haemocytes of *Eriocheir sinensis* in response to *Spiroplasma eriocheiris* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 68 : 289 – 298.