

青蛤 (*Cyclina sinensis*) *ERK* 基因的克隆及其在 Poly I:C 刺激下的表达分析

侯梓园, 石雅峰, 姚远, 潘宝平, 闫春财* (天津师范大学生命科学学院天津市动植物重点抗性实验室, 天津 300387)

摘要 [目的]研究青蛤(*Cyclina sinensis*)*ERK*基因的克隆及在Poly I:C刺激下的表达情况。[方法]在已建立的青蛤转录组文库中筛选得到青蛤细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases)基因类似序列。运用生物信息学软件在线对该基因进行结构分析。采用PCR技术克隆基因,并使用实时荧光定量PCR技术克隆得到*CsERK*基因在青蛤5个不同组织中的表达情况及在干扰素诱导剂Poly I:C的刺激下*ERK*基因在青蛤血淋巴中的时序性表达情况。[结果]*ERK*基因序列全长为2 407 bp,开放阅读框长1 338 bp,共编码445个氨基酸。*ERK*基因在青蛤的血淋巴、外套膜、闭壳肌、肝脏和鳃5个组织中均表达,在血淋巴中表达量最高,闭壳肌中表达量最低。青蛤*ERK*基因在Poly I:C胁迫下表达量在6 h时达到最大值,与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。[结论]*ERK*基因所指导合成的蛋白是青蛤重要的免疫信号通路蛋白。

关键词 青蛤;*ERK*基因;Poly I:C;荧光定量PCR

中图分类号 S944.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)01-0099-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.01.031



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Cloning and Expression of *ERK* in *Cyclina sinensis* and Its Expression under Poly I:C Stress

HOU Zi-yuan, SHI Ya-feng, YAO Yuan et al (College of Life Sciences, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract [Objective] To study the cloning and expression of *ERK* in *Cyclina sinensis* and its expression under Poly I:C stress. [Method] Get the sequence of extracellular regulated protein kinases in *C. sinensis* by building the transcriptome library, gene structure was analyzed by on-line bio-information software. Analysis the expression in some organisations from *C. sinensis* by PCR and RT-PCR, and analysis the expression of *CsERK* in haemolymph after stimulated by poly I:C. [Result] The sequence length of *CsERK* was 2 407 bp, the open reading frame was 1 338 bp and encoding 455 amino acids. The *CsERK* gene was expression in haemolymph, liver, coat film, adductor muscle and gill, and the expression level of *CsERK* in its haemolymph was the highest and in the closed shell was the lowest. After stimulated by poly I:C, the expression level increased obviously and reached to the max at 6 h, and had a very significantly difference with the control group ($P < 0.01$). [Conclusion] The product guided by the *ERK* gene was an important immune signaling pathways protein in *C. sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*; *CsERK* gene; Poly I:C; Real-time quantitative PCR

青蛤(*Cyclina sinensis*)是一种常见的海产经济贝类,其食用味道好而且具有很高的营养价值,青蛤养殖是我国海产品养殖的支柱型产业,青蛤本身具有重要的药用价值^[1]。但是随着近年来我国水产行业大环境的恶化,青蛤在养殖过程中出现了大规模的病害和死亡现象,给近海地区的经济带来了巨大的损失^[2]。对青蛤的健康养殖、抗病害机制及免疫调控的研究迫在眉睫,这一研究不仅可以为解决青蛤在养殖过程中出现的死亡现象提供初步的理论研究结果,而且可以为进一步研究青蛤及其他无脊椎动物的免疫方式积累重要的试验依据。

Toll样受体(toll-like receptors, TLR)是原始且保守的免疫系统受体之一^[3]。Toll样受体信号通路主要用于调控一些参与免疫的蛋白表达。细胞外刺激作用于细胞需要通过MAPK信号介导的三级激酶级联反应^[4]。而细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)是MAPK家族中的一员,它是将信号从表面受体传导至细胞核的关键。在脊椎动物中已有*ERK*基因的相关研究,但*ERK*基因

在软体动物中的相关研究鲜见报道。

聚肌胞苷酸(polyinosinic:polycytidylic acid, Poly I:C)是一种人工合成的双链RNA,可模拟病毒进行试验^[5]。作为一种高效的诱导剂,聚肌胞苷酸可在鱼类等海产品及临床医学的小鼠模型研究中作为病毒类似物进行侵染试验。该试验中,通过Poly I:C体外注射得到*ERK*干扰后的基因,以其为模板测定表达量的变化。

免疫生物学研究是水产养殖中病害防治的理论基础。青蛤只具有先天性免疫系统,而抗生素的使用会使生物产生抗药性。所以,研究贝类免疫相关因子的作用机制在发展水产养殖业中刻不容缓。免疫增强剂的研发和使用将在极大程度上发挥贝类的先天特异性免疫调节功能,大大提高贝类抵御病原体的能力,对水环境保护、贝类增殖养殖业以及水产品卫生安全等都具有重要的意义^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料 青蛤采购于天津王顶堤海鲜品市场,暂养于密度1.02~1.04 g/cm³的中性海水中,持续供氧,水温22℃左右^[7],投喂5%小球藻。饲喂大约7 d,选取体表完好、个体形态差别较小的青蛤[平均壳宽(19.12±0.56) mm、平均壳长(29.13±1.22) mm、平均壳高(29.51±1.46) mm]进行分组试验。

1.2 方法

1.2.1 材料处理。在注射前选取若干青蛤,提取血淋巴、鳃、肝脏、闭壳肌、外套膜组织约50 mg冷冻备用;配置浓度

基金项目 天津市自然科学基金项目(18JCYBJC96100);天津市科学技术普及项目(17KJXMSF00040);天津市高校“中青年骨干创新人才培养计划”(135305JF79);天津师范大学基金项目(043135202-XK1706,043135202-XB1715);天津市高等学校科技发展基金项目(20090608);天津师范大学引进人才基金项目(SRL104);大学生创新创业计划项目(201810065337)。

作者简介 侯梓园(1992—),女,河北邢台人,硕士研究生,研究方向:分子免疫与分子系统学。*通信作者,副教授,硕士生导师,博士,从事动物分子系统学与免疫学研究。

收稿日期 2018-09-14

约为 1 μg/g 的 Poly I;C^[8]。将余下青蛤随机分为试验组和对照组,每组设置 3 个平行。在试验组青蛤的闭壳肌部位中注射 Poly I;C 50 μL,在对照组青蛤中注射等量灭菌海水。分别在注射后的 0、3、6、12、24、48、96 h 提取青蛤的血淋巴。准确称取各组织 50 mg,冷冻于液氮中备用。

1.2.2 青蛤转录组文库的构建。将提取的青蛤 6 个组织于液氮中研磨充分后,置于 1 mL Trizol 中提取组织的总 RNA。按照 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 法分离纯化总 RNA。用随机引物逆转录法将纯化后的 RNA 反转录成 cDNA。将得到的 cDNA 末端修饰、加尾等,用以制备整个文库。采用 Unigene 编码蛋白框 ORF 预测分析去冗余后的数据,再经 Blast 分析后,从中筛选得到青蛤 *ERK* 基因类似序列。再利用筛选得到的青蛤 *ERK* 基因类似序列进行克隆,设计克隆时所用引物 *CsERK-F1*、*CsERK-R1*(表 1)。

表 1 试验涉及的 PCR 和 qPCR 引物

Table 1 The primers about *CsERK* gene to PCR and qPCR

序号 Code	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
1	<i>β-actin-F</i>	CACCACAACCTGCCGAGAG
2	<i>β-actin-R</i>	CCGATAGTGTACCTGACC
3	<i>CsERK-F1</i>	CGCGGATCCTACCAGAATCTCAGGCC
4	<i>CsERK-R1</i>	CCCAAGCTTTATATACGGGTGCATTA
5	<i>CsERK-F2</i>	TCCGTGTCCGCTTCT
6	<i>CsERK-R2</i>	TCCCTGAGCACCTGA

1.2.3 生物信息学分析。基因克隆产物与 GenBank 中的核酸数据库进行 BlastX (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分析^[9],利用开放阅读框 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线分析软件分析其开放阅读框,使用 SignalP 3.0 分析该基因的信号肽序列,利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测结构域,ProtParam 工具在线预测此序列的分子量、分子式和等电点,使用 ClustalW 对氨基酸序列进行同源性分析和多重比对^[10]。

1.2.4 *ERK* 基因在青蛤各组织内的表达。利用 Trizol 法提取青蛤血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌和鳃的总 RNA,后反转成 cDNA,放入 -20 ℃ 冰箱中保存备用^[11]。以 *β-actin* 基因为内参基因,实时定量引物分别为 *β-actin-F*、*β-actin-R*(表 1)。反应在 LightCycler 480 实时定量 PCR 仪上进行,扩增体系为 20 μL,反应程序为 94 ℃ 预变性 30 s;94 ℃ 5 s,60 ℃ 10 s,40 个循环;融解 95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 5 s;50 ℃ 降温 30 s^[12]。采用 2^{-ΔΔCT} 法进行数据处理^[13-14],并使用 SPSS 软件进行数据分析^[15]。

1.2.5 Poly I;C 刺激下 *CsERK* 基因在血淋巴内的时序性表达。利用 Trizol 法提取青蛤被 Poly I;C 侵染后各时间点血淋巴的总 RNA,反转录成 cDNA。荧光定量 PCR 引物为 *CsERK-F2*、*CsERK-R2*(表 1)。采用 2^{-ΔΔCT} 法进行数据处理,并使用 SPSS 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 青蛤 *ERK* 基因的结构 通过生物信息学软件分析得到 *CsERK* 基因全长 2 407 bp,开放阅读框长 1 338 bp,共编码

445 个氨基酸(图 1);具有 1 个 S_Tkc 结构域(70~366 aa);理论分子量为 50.51 kDa,等电点为 6.35,分子式为 C₂₂₂₅H₃₄₉₈N₆₂₄O₆₆₂S₂₉,氨基酸组成中亮氨酸(Leu)最高,占 8.8%。该基因无跨膜区;开放阅读框内含 1 个 S-Tkc 结构域,从分子进化上看,该基因与光滑双脐螺中的基因相似度最高。该研究的基因在 GenBank 登陆注册,*CsERK* 注册号为 MF974208。

```

1 ATGAGCTTACAACCTCTTCAGAGTATACGAAGAAAATCTGTGTC
  M S L Q L L Q S I R R K S C V
46 GATCTCCGTGTCGCCCTTCGTCAAGGGATCGCAATGGTCAATTA
  D L R V A F C G I C N G Q L
91 AGTCTGTCACATTTAAACAGTTGTCACAGGACTTACGCAATGAGT
  S L S H L T S C H R T Y A M S
136 AACCGCATAATGACATGTCACAGTATGTCAGAGTGAAGTTGGC
  N Q H N D M S Q Y V T V E V G
181 GACTCCACATTCACATTCTAAAACGTTACCAGAATCTCAGGCCT
  D S T F T I L K R Y Q N L R P
226 ATAGGCTCAGGTGCTCAGGGAATGTCTGTGCTGCATATGACAGT
  I G S G A Q G I V C A A Y D S
271 GTGACAGACCAAAAATGTCAAAATAAGAAATTAAGTCGGCCATTC
  V T D Q N V A I K K L S R P F
316 CAGAATGTTACACATCTAAAAGAGCCTACAGAGAATTTGTTCTTA
  Q N V T H A K R Y A R E F V L
361 ATGAAGTTAGTCAATCATAAAAATATAATGGTTTGTGAATGCA
  M K L V N H K N I I G L L N A
406 TTCACACCTCAGAGGTTCTTAGAAGAATTTCAAGATGTCTATCTA
  F T P Q R S L E E F Q D V Y L
451 GTCATGGAATTAATGGATGCCAATCTGTCTCAAGTTATACAGATG
  V M E L M D A N L C Q V I Q M
496 GATCTAGATCATGAAAGAATGTCATATCTTCTCTACCAGATGTTG
  D L D H E R M S Y L L Y Q M L
541 TGTGGGATAAAAACATTTACATCTGCTGGAATTTACACAGGGAT
  C G I K H L H S A G I I H R D
586 CTGAAGCCATCCAATATAGTTGTCAAATCTGACTGTACATTGAAG
  L K P S N I V V K S D C T L K
631 ATCTTGGATTTTGGTCTAGCAAGAACAGCTGGTACTGGGTTTATG
  I L D F G L A R T A G T G F M
676 ATGACACCTATGTTGTGACACAGGTTATACCGGACACAGGTT
  M T P Y V V T R Y Y R A P E V
721 ATACTTGGTATGGGCTATAAAGAAAATGTTGATATATGGTCAGTG
  I L G M G Y K E N V D I W S V
766 GGATGTATCATGGCAGAGTTGATACGAGTGGTGTCTATGTTCCA
  G C I M A E L I R G V M F P
811 GGAAGTGATCATAGATGATGCAATGAAATGATGAACTGAACTA
  G S D H I D Q W N K I I E Q L
856 GGTACACCTTACAGGAATTTATGAACCGGTTACAACCACTGTT
  G T P S Q E F M K R L Q P T V
901 AGAAACTATGTAGAAAATAGACCCAAATATGCTGGTTATAGTTTC
  R N Y V E N R P K Y A G Y S F
946 GAAAAACTGTTCCCTGATGTGTTGTTTCCCTGACAGTACTGAA
  E K L F P D V L F P P D S T E
991 CACCAAGGATTACGATCTACTTTTGCACGGGACTTGTGTCAAAA
  H Q G L R S T F A R D L L S K
1036 ATGCTTGTGATAGATCCAGATAAACCAATATCAGTGGATGATGCA
  M L V I D C P D K R I S V D D A
1081 TTAATGCGCCGATATATAAACGTTGGTATGACGAATCTGAGGTT
  L M H P Y I N V W Y D E S E V
1126 AATGGGGTCCGCCAGGTGCCTATAATCATGCAGTAGATGAGAAA
  N G A A P G A Y N H A V D E K
1171 GAACACACCGTAGAACAATGGAAGAACTGATCTATAATGAGGTA
  E H T V E Q W K E L I Y N E V
1216 ATGGAGAATGAGAACAGACAGGGGTGCCATAATGCAGCTATG
  M E N E N R D R V S H N A A M
1261 CAAAACCTTCTGTACCAGCGGTGCGAGCAACAACGAGGACGTA
  Q N H S V P D G A S N N E A V
1306 ATGGATGGAATGCGGGCGGATCAAAGATAA
  M D G I A G G S K R *

```

注:下划线部分表示起始密码子,*为终止密码子

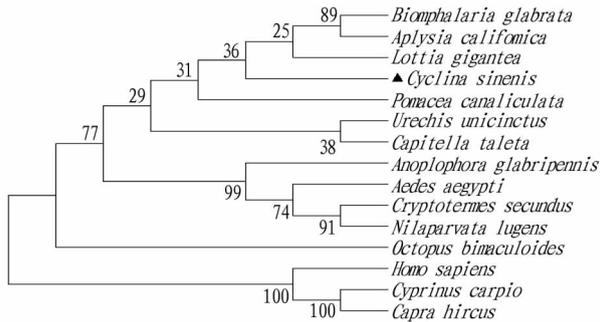
Note:The underlined part indicates the start codon,* is the stop codon

图 1 青蛤 *ERK* 基因的开放阅读框及结构域

Fig.1 The open reading frame and the structural domain of *CsERK*

2.2 青蛤 *ERK* 基因的分子系统学分析 利用 NCBI 数据库,将 *CsERK* 基因与数据库中其他生物的 *ERK* 基因进行同

源性比对^[16], 比对结果利用 MEGA5.4 软件构建 *CsERK* 基因的系统发育树(图 2), 置信度利用 Bootstrap1000 个循环拓扑结构进行检验^[17]。结果发现, 海蜗牛 (*Aplysia californica*)、霸王莲花青螺 (*Lottia gigantea*)、光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) 与 *CsERK* 基因在同一分支, 青蛤 *ERK* 基因与光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) *ERK* 基因的同源性最高, 高达 88%。



注: 构建 *ERK* 基因系统树选用物种及其序列号为 *Biomphalaria glabrata* (XP_013070261.1); *Aplysia californica* (NP_001191547.1); *Octopus bimaculoides* (KOF72305.1); *Pomacea canaliculata* (PVD37484.1); *Urechis uncinatus* (ALB00838.1); *Cyprinus carpio* (BAD23843.1); *Capra hircus* (AFV73335.1); *Homo sapiens* (AAY44299.1); *Anoplophora glabripennis* (XP_018561851.1); *Aedes aegypti* (XP_021703782.1); *Capitella teleta* (ELU16605.1); *Cryptotermes secundus* (PNF21055.1); *Nilaparvata lugens* (XP_022189790.1); *Lottia gigantea* (XP_009063534.1); *Cyclina sinensis* (MF974208)

图 2 青蛤 *ERK* 基因与其他物种的 *ERK* 基因氨基酸序列比对结果
Fig. 2 The phylogenetic tree constructed by the amino acid sequence of *CsERK* and *ERKs* from other species

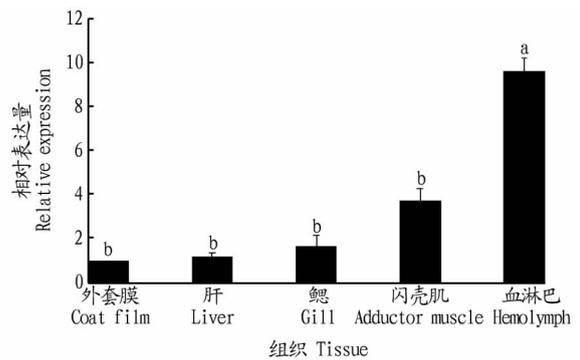
2.3 青蛤 *ERK* 基因的表达分析

2.3.1 *CsERK* 基因在组织间的表达分析。以 β -actin 基因为对照, 使用荧光定量 PCR 的方法, 对青蛤的外套膜、闭壳肌、鳃、肝脏和血淋巴 5 种组织进行基因的表达量测定, 结果如图 3 所示。根据数据得到, *CsERK* 基因在青蛤 5 个组织中均可表达, 其中表达量最高的组织为血淋巴, 剩下依次为闭壳肌、鳃、肝脏, 在外套膜中 *ERK* 基因的表达量最低。

2.3.2 *CsERK* 基因在 Poly I:C 刺激下的表达分析。试验组青蛤在 Poly I:C 侵染后, 按刺激时间点对应的青蛤进行血淋巴取样, 并对不同组织样品中的 *ERK* 基因表达量进行分析, 结果如图 4 所示。以海水刺激为对照组, Poly I:C 侵染组为试验组, *CsERK* 基因荧光定量的结果显示其在 6 h 时表达量达最大值, 与对照组比差异显著 ($P < 0.05$), 约为对照组的 3.17 倍, 6 h 后表达量开始下降, 逐渐恢复稳定水平。

3 结论与讨论

随着科学探究的逐渐深入, 对青蛤的研究也从宏观的形态学和繁殖发育等方面逐步向分子水平方向发展^[18]。*ERK* 基因是 Toll 样受体通路 MAPK 家族中的一员^[19], *ERK* 在脊椎动物中病理学及免疫学研究中已有报道, 但在贝类等无脊椎动物中还鲜有研究。

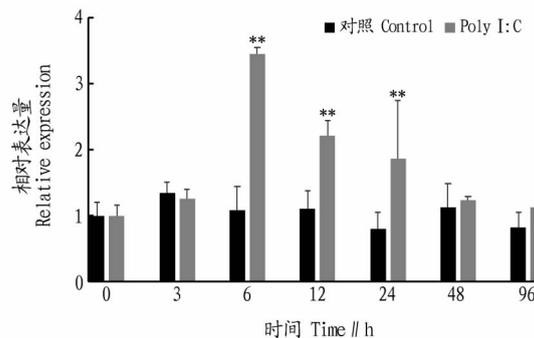


注: 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different letters show significant differences ($P < 0.05$)

图 3 青蛤 *ERK* 基因在组织间的相对表达量

Fig. 3 The expression of *CsERK* in organs revealed by real time PCR



注: ** 表示该时间点基因的转录表达水平与同组注射前 (0 h) 相比差异极显著 ($P < 0.05$)

Note: ** indicates that the transcriptional expression level of the gene at this time point is significantly different from that of the same group (0 h) before injection ($P < 0.05$)

图 4 Poly I:C 侵染青蛤 *ERK* 基因后相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *CsERK* in *C. sinensis* after infection with Poly I:C

该研究在构建青蛤转录组文库后, 筛选出细胞外调节蛋白激酶, 并对该基因进行生物信息学分析, 得到基本的理论数据。*CsERK* 基因与光滑双脐螺中的 *ERK* 基因相似度最高。与青蛤其他基因同源性较高的物种也大多为贝类^[20], 如与青蛤 *AP-1* 基因同源性最高的物种为盘鲍 (*Haliotis discus*) 和菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)。由此表明青蛤 *ERK* 基因的分子生物学特性与软体动物在分类学上的进化地位保持一致性。

使用荧光定量 PCR 技术研究了正常生理环境下 *CsERK* 基因在体内 5 个不同组织中的表达情况及外界病毒类似物刺激下血淋巴中时序性表达情况。经 qPCR 技术检测后显示, 青蛤 *ERK* 基因在其血淋巴、外套膜、肝脏、闭壳肌和鳃 5 个组织中普遍表达, 血淋巴中表达量最高, 其次为肝, 外套膜中表达量最少。贝类免疫主要为非特异性免疫^[21], 在青蛤体内, 血细胞能产生体液因子, 例如凝集素、非特异性水解酶、抗菌肽等调控因子^[22]。因此, 血液在青蛤的免疫系统中起到重要作用, 众多贝类免疫相关基因在血淋巴中的表达量

显著高于其他组织。青蛤血细胞中的 *ERK* 基因上调最为明显,说明血淋巴作为软体动物非特异性免疫防御的首要组织担当着防御的重任,印证了青蛤的非特异性免疫应答机制。

目前贝类的病原菌包括细菌、真菌、病毒等^[23]。在体外 Poly I:C 模拟刺激后目的基因的表达量在 3 h 时开始上升并达到最大值,在 6、12 h 时试验组的表达量发生明显变化。在病毒类似物 Poly I:C 刺激下该基因的表达量有明显变化,这表明 *ERK* 基因作为青蛤体内潜在的免疫相关基因,参与了青蛤应答病毒感染的免疫反应。

针对近年暴发的青蛤病害现象,从青蛤的分子免疫通路入手,结合生物信息学、分子系统学及分子免疫学手段,对青蛤中的基因进行了研究。对青蛤分子免疫学领域的研究,不仅在提高青蛤存活率、防止青蛤季节性大批量死亡等方面提供了重要的理论基础,而且为其在医药开发方面提供了分子免疫学的理论保障。

参考文献

[1] 宋欣,张丽岩,高玮玮,等. 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染对青蛤 (*Cyclina sinensis*) 磷酸酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 254-258.

[2] 张峰,赵婷,任毅鹏,等. 青蛤 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆及其在组织间的表达分析[J]. 四川动物, 2014, 33(4): 563-567.

[3] 李杰,周庆,何孝军,等. MiR-146b 在急性 Stanford A 型主动脉夹层患者外周血清和主动脉组织中的表达及其临床意义[J]. 中南大学学报(医学版), 2017, 42(10): 1136-1142.

[4] 李刚,黎介寿,祁晓平. p38 丝裂原活化蛋白激酶信号级联在炎症反应中的作用[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(8): 737-740.

[5] 张景熙,胥武剑,韩一平,等. Poly(I:C)和 LPS 共刺激对人气道上皮细胞趋化因子表达的影响及机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(10): 1046-1050.

[6] 马贵华,陈道印,刘六英,等. 多酚对河蟹免疫功能的影响[J]. 饲料工业, 2007, 28(4): 9-11.

[7] 秦丽雅,崔肇春. 有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)在信息传递中的作用[J]. 生命的化学(中国生物化学会通讯), 1995, 15(4): 17-20.

[8] 高玮玮,潘宝平,闫春财. 青蛤 (*Cyclina sinensis*) TRAF6 基因克隆及其在 Poly I:C 胁迫下的免疫应答[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(5): 1041-1046.

[9] ZHANG Z L, SONG Q B, LIN M Q, et al. Immunomodulated signaling in macrophages: Studies on activation of Raf-1, MAPK, cPLA₂ and secretion of IL-12[J]. Science in China(Series C), 1997, 40(6): 583-592.

[10] 傅红. 受体酪氨酸激酶-Ras-MAPK 信号转导途径研究进展[J]. 国外医学(分子生物学分册), 1994, 16(6): 245-249.

[11] INAMORI K, ARIKI S, KAWABATA S. A Toll-like receptor in horseshoe crabs[J]. Immunol Rev, 2004, 198: 106-115.

[12] BELL J K, MULLEN G E D, LEIFER C A, et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors[J]. Trends Immunol, 2003, 24(10): 528-533.

[13] AKIRA S. Toll-like receptor signaling[J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 38105-38108.

[14] AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signalling[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499-511.

[15] 李基光,王三文,张德咏,等. RNAi 技术的研究及其在植物上的应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(8): 3897-3899.

[16] 王玉梅,潘宝平,丁丹,等. 青蛤丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)基因的克隆及其在鳃弧菌胁迫下的表达分析[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2017, 48(5): 526-530.

[17] WOOTTON E C, DYRYNDA E A, RATCLIFFE N A. Bivalve immunity: Comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15(3): 195-210.

[18] XU Y W, TAO X, SHEN B H, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains[J]. Nature, 2000, 408: 111-115.

[19] YAMANAKA H, SUGIYAMA K, FURUTA H, et al. Cytolytic action of *Vibrio vulnificus* hemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity[J]. Journal of medicinal microbiology, 1990, 32(1): 39-43.

[20] TAKEDA K, AKIRA S. Toll-like receptors in innate immunity[J]. Int Immunol, 2005, 17(1): 1-14.

[21] TAKEDA K, AKIRA S. TLR signaling pathways[J]. Semin Immunol, 2004, 16(1): 3-9.

[22] UEMATSU S, AKIRA S. Innate immune recognition of viral infection[J]. Uirusu, 2006, 56(1): 1-8.

[23] HWANG S D, ASAH I T, KONDO H, et al. Molecular cloning and expression study on Toll-like receptor 5 paralogs in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(4): 630-638.

(上接第 89 页)

表 2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal test result

处理号 No.	因素 Factor				活菌数 Viable count 10 ⁶ CFU/mL
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	325
2	1	2	2	2	339
3	1	3	3	3	497
4	2	1	2	3	318
5	2	2	3	1	306
6	2	3	1	2	224
7	3	1	3	2	233
8	3	2	1	3	205
9	3	3	2	1	329
K ₁	387	292	251	320	
K ₂	283	283	329	265	
K ₃	256	350	345	340	
R	131	67	94	75	

中的乳酸菌的活菌数高达 4.97×10^8 CFU/mL, 对对虾养殖所用乳酸菌的发酵生产有一定的参考价值。

参考文献

[1] 程秀玉,王炎松. 海南省养殖南美白对虾药物残留检测[J]. 热带农业工程, 2016, 40(3): 1-3.

[2] 桂建芳. 水生生物学科学前沿及热点问题[J]. 科学通报, 2015, 60(22): 2051-2057.

[3] ESIÖBU N, ARMENTOS L, IKE J. Antibiotic resistance in soil and water environments [J]. Int J Environ Health Res, 2002, 12(2): 133-144.

[4] WANG Y B, LI J R, LIN J D. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook [J]. Aquaculture, 2008, 281(1/2/3/4): 1-4.

[5] 张家国,刘翠玲. 乳酸菌代替抗生素在水产养殖上的应用[J]. 中国水产, 2014(7): 66-68.

[6] KONGNUM K, HONGPATTARAKERE T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi* [J]. Fish&shellfish immunology, 2012, 32(1): 170-177.

[7] WANG W, LI M, FANG W H, et al. A predictive model for assessment of decontamination effects of lactic acid and chitosan used in combination on *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps [J]. International journal of food microbiology, 2013, 167(2): 124-130.

[8] 张玲. 一株对虾肠道益生菌的筛选及其作用机理和应用效果的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2007.

[9] 文金顺. 海南土著乳酸菌筛选及其对凡纳滨对虾生长影响的研究[D]. 海口:海南大学, 2017.

[10] 杨吉霞,张利玲,蒋厚阳,等. 眉山泡菜中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(17): 158-163.

[11] 华鹤良. 乳酸菌的分离鉴定及其抗菌肽与发酵性能研究[D]. 扬州:扬州大学, 2014.

[12] 曾议霆,郭溪浪,周康,等. 富硒乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 178-182.

[13] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999: 1-25.