

CpG 寡脱氧核苷酸对中华绒螯蟹非特异性免疫指标的影响

李红霞^{1,2}, 李义², 俞菊华¹, 徐跑¹

(1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 苏州大学 生命科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 细菌 DNA 和人工合成的含 CpG 基序的未甲基化寡脱氧核苷酸 (ODNs) 均能刺激机体的免疫反应。本研究将鱼的免疫刺激剂寡脱氧核苷酸序列 ODN-1670 (含 1 个 CpG 基序) 和 ODN-R (含 1 个反向 CpG 基序, 即 GpC) 按 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 进行体腔注射, 同时以注射 0.1 mL 生理盐水组与未进行任何处理的空白组作为对照。在注射前 (0 d) 和注射后第 1 天、3 天、5 天、8 天对血细胞呼吸爆发活性 (O_2^- 产量)、过氧化物酶 (POD) 活性、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性进行测定。结果显示, 注射 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ODN-1670 能显著增强实验蟹血细胞的呼吸爆发活性 ($P<0.05$), 注射 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量的 ODN-1670 能显著增强实验蟹血清的 POD、SOD 活性 ($P<0.05$)。而注射 3 种剂量的 ODN-R 对血细胞呼吸爆发活性、POD 活性和 SOD 活性均没有显著影响 ($P>0.05$)。本实验结果表明, 注射适量 ODN-1670 能增强中华绒螯蟹的非特异性免疫功能。[中国水产科学, 2008, 15(5): 801–807]

关键词: 中华绒螯蟹; CpG-ODN; 呼吸爆发; 过氧化物酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S963.73

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-801-07

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹, 是中国主要的名优水产养殖品种之一。针对甲壳动物不具备特异性免疫机能的生理特点, 开发新型高效的免疫增强剂来调节中华绒螯蟹的非特异性免疫, 已成为目前国内外学者的研究热点。目前, 国内外关于甲壳动物免疫增强剂的研究主要集中在多糖类和中草药方面, 对核酸类免疫增强剂的研究较少^[1-4]。

CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG-oligodeoxynucleotides, CpG-ODN), 是人工合成的含有 CpG 基序的寡聚脱氧核糖核苷酸, 能够模拟细菌 DNA, 有免疫刺激活性。近年来的研究表明, CpG-ODNs 在体内外均能刺激鱼类的免疫机能^[5-9], 但有关 CpG-ODNs 对甲壳动物免疫功能影响的研究报道较少。Chuo 等^[10]发现 CpG-ODN 能增强罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的酚氧化酶活性。近期作者研究发现, CpG-ODNs 能显著增强中华绒螯蟹血清溶菌酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性^[11]。但迄今为止, 有关 CpG-ODNs 对中华绒螯蟹其他非特异性免疫指标的影响尚未见报道。本研究探讨了 ODN-1670 (含 1 个 CpG 基序) 和 ODN-R (含 1 个反向 CpG 基序,

即 GpC) 对中华绒螯蟹呼吸爆发活性 (O_2^- 产量)、过氧化物酶 (POD) 活性及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性 3 个免疫学指标的影响, 以期更深入研究 CpG-ODNs 对中华绒螯蟹免疫功能的影响, 以及为 CpG-ODNs 在中华绒螯蟹养殖中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

ODN-1670 及 ODN-R 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 全链硫代修饰, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 纯化, 纯度为 99.99% (表 1)。

1.2 实验设计

360 只健康中华绒螯蟹 (平均体质量 52.8 g) 购于江苏省吴江市某水产养殖场, 运回后饲养于室内循环水养殖系统中, 暂养 1 周后进行实验。暂养期和实验期均 24 h 充气, 控制水温在 $(22\pm 2)^\circ\text{C}$, 每天以蟹体质量的 3% 投喂成蟹颗粒饲料。

实验设 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 种剂量的 ODN-1670 处理组; 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 种剂量的 ODN-R 处理组; 生理盐水注射组和未作

收稿日期: 2008 01 09; 修订日期: 2008 03 20.

基金项目: 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放课题 (BM2007-04); 苏州科技攻关项目 (SNZ-0303); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2007JBFB10)。

作者简介: 李红霞 (1982-), 女, 硕士, 实习研究员, 主要从事水生生物技术研究. E-mail: lihx@ffrc.cn

通讯作者: 李义 (1966-), 男, 副教授, 主要从事水生动物病害防治工作. E-mail: ly5980@sina.com.cn

任何处理的对照组（以下简称对照组）各1组，共8个处理组。每个处理组均设3个平行，每1平行中放养蟹12只。在蟹的第3或第4步足的基关节膜处，ODN处理组按体质量每只分别注射质量浓度为0.5 μg/mL、2.5 μg/mL、12.5 μg/mL的ODN溶液约0.1 mL左右，使注射量分别达到1 μg/kg、5 μg/kg、25 μg/kg体质量的剂量；生理盐水组每只注射

0.85%的灭菌生理盐水0.1 mL，未处理的空白对照组不注射任何溶液。在注射之前（即0 d）和注射后第1天、3天、5天、8天，分别在每一平行中随机取蟹2只，使用一次性注射器于蟹第3或第4步足的基关节膜处抽取血淋巴，将血淋巴与抗凝剂以1:1体积混匀于1.5 mL Eppendorf管内用于分离血细胞；将蟹断肢取血用于分离血清。

表1 合成的CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODNs)的序列和特征

Tab.1 Sequences and characters of the synthetic CpG-ODNs

名称 Name	DNA 序列 (5' -3') DNA sequence	长度 /bp Length	CpG 基序 CpG motif	CpG 基序数 Number of CpG
ODN-1670	ACC GAT <u>AAC GTT</u> GCC GGT GAC G	22	AACGTT	1
ODN-R	ACC GAT AAG <u>CTT</u> GCC GGT GAC G	22	Non-CpG	0

注：ODN-1670 为 Jørgensen 等^[6]报道的大西洋鲑的合适刺激序列；ODN-R 在 ODN-1670 基础上设计，含1个CpG反向序列(GpC)，其余碱基与 ODN-1670 相同。

Note: ODN-1670 is the optimal stimulant sequences of *Salmo salar* reported by Jørgensen et al^[6]; ODN-R contains a reversed CpG sequence (GpC) based on ODN-1670, other bases are identical to ODN-1670.

1.3 血细胞呼吸爆发活性的测定

参照 Song 等^[12]的氯化硝基四氮唑蓝(NBT)还原法。以相对超氧阴离子(O₂⁻)产量即实验组 OD₆₃₀ 值与对照组 OD₆₃₀ 值的比值来表示每个处理组的中华绒螯蟹血细胞呼吸爆发活性。

1.4 血清过氧化物酶(POD)相对活性的测定

采用史成银等^[13]的方法稍作改进。在96孔酶标板中加入血清(20 μL/孔)，然后加入180 μL显色缓冲液，置于酶标仪中，读取490 nm处的OD值(A₀)。向样品所在孔中加20 μL显色液(4 mg邻苯二胺, 4 μL 30% H₂O₂，配成10 mL显色缓冲液)，摇匀后放入酶标仪中，避光显色15 min，读取490 nm处的OD值(A₁)。血清POD的相对活性以A_{POD}=A₁-A₀计算。

1.5 血清超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

按照超氧化物歧化酶测定试剂盒(南京建成生物研究所生产)的操作说明进行，采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定SOD活性。

SOD活性定义为：每1 mL反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD的量为一个亚硝酸盐单位(NU)。

$$\text{SOD 活力 (NU/mL)} = \frac{\text{对照管吸光值} - \text{测定管吸光值}}{\text{标准管吸光值} / 50\%} \times \text{稀释倍数}$$

1.6 统计分析

所有待测样品均平行检测3次后取平均值，检测结果均以平均值±标准误($\bar{X} \pm \text{SE}$)表示。所得数据使用统计软件SPSS13.0处理，单因素方差(ANOVA)分析，Tukey's检验法进行均值间多重比较。 $P > 0.05$ 认为结果差异不显著， $P < 0.05$ 认为结果差异显著。

2 结果与分析

2.1 CpG-ODNs对中华绒螯蟹血细胞呼吸爆发活性的影响

2种CpG-ODN对中华绒螯蟹血细胞呼吸爆发活性的影响如图1和图2所示。由图1可知，在注射ODN-1670后的第1天，中、低剂量(1 μg/kg、5 μg/kg)处理组的血细胞呼吸爆发活性有所升高，但与对照和生理盐水注射组差异不显著($P > 0.05$)，高剂量(25 μg/kg)处理组的呼吸爆发活性显著高于对照组与生理盐水注射组($P < 0.05$)，相对超氧阴离子(O₂⁻)产量达到 1.639 ± 0.100 ，但与中、低剂量处理组间差异不显著($P > 0.05$)。3个处理组的呼吸爆发活性均在第1天时达到最大值然后下降，至第8天时恢复到正常水平。在相同采样时间点，3种剂量处理组间的呼吸爆发活性没有显著差异($P > 0.05$)。由图2可知，在注射ODN-R后实验蟹的血细胞相对超氧阴离子产量最高值出现在第

3 天高剂量 (25 $\mu\text{g/kg}$) 处理组, 达到 1.320 ± 0.090 ; 但是与对照组及生理盐水注射组相比, 差异均不显著 ($P>0.05$)。中、低剂量 (1.5 $\mu\text{g/kg}$) 处理组在第 1

天达到最高, 但与其他处理组相比, 均无显著差异 ($P>0.05$)。结果还显示, 在相同采样时间点, 3 个处理组之间没有显著差异 ($P>0.05$)。

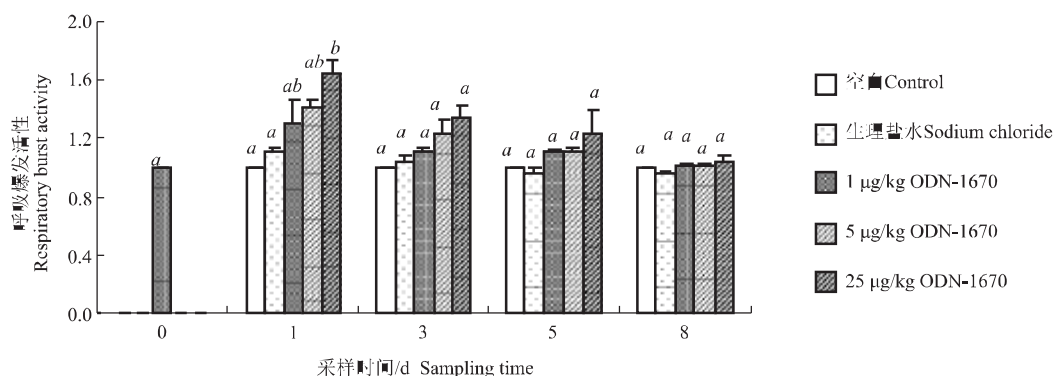


图1 ODN-1670 对中华绒螯蟹血细胞呼吸爆发活性 (O_2^- 产量) 的影响

1. 柱及短线表示每个处理组的平均数及标准误; 2. 柱上不同字母表示同一采样时间各处理组之间差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 1 Effects of ODN-1670 on respiratory burst activity (production of superoxide anion) of haemocytes of *Eriocheir sinensis*
1. Each bar represents mean value with standard error of each treatment; 2. data at the same sampling time with different letters are significantly different ($P<0.05$) from each other.

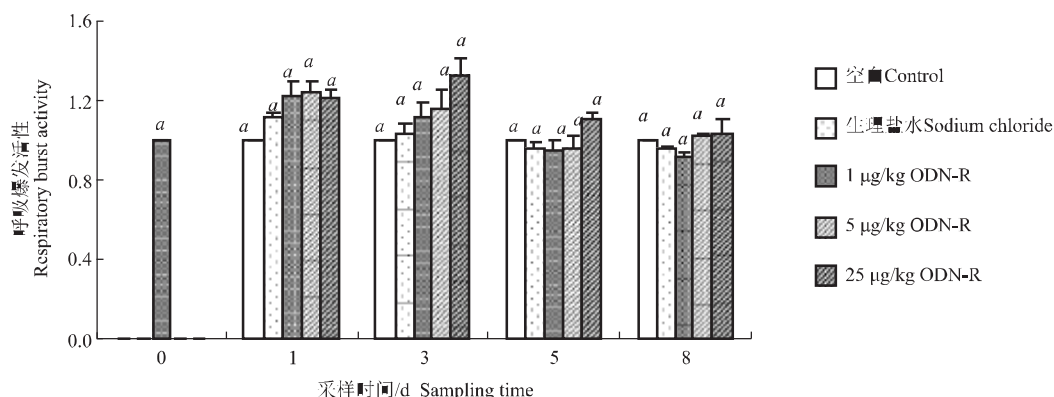


图2 ODN-R 对中华绒螯蟹血细胞呼吸爆发活性 (O_2^- 产量) 的影响

1. 柱及短线表示每个处理组的平均数及标准误; 2. 柱上相同字母表示同一采样时间各处理组之间差异不显著 ($P>0.05$)。

Fig. 2 Effects of ODN-R on respiratory burst activity (production of superoxide anion) of haemocytes of *Eriocheir sinensis*

1. Each bar represents mean value with standard error of each treatment; 2. data at the same sampling time with same letters are not significantly different ($P>0.05$) from each other.

2.2 CpG-ODNs对中华绒螯蟹血清过氧化物酶(POD)相对活性的影响

2 种 CpG-ODNs 对中华绒螯蟹血清 POD 相对活性的影响结果如图 3、4 所示。由图 3 可见, 在注射 ODN-1670 后的第 1 天, 1 $\mu\text{g/kg}$ 、5 $\mu\text{g/kg}$ 、25 $\mu\text{g/kg}$ 3 个处理组的血清 POD 活性均显著高于空白对照及生理盐水注射组 ($P<0.05$), 其中 25 $\mu\text{g/kg}$ 组持

续至第 8 天; 第 3 天各组 POD 活性稍有下降; 第 5 天 3 个处理组 POD 活性较第 3 天有所上升。结果还显示, 高剂量组 POD 活性在第 1 天、第 8 天时显著高于低剂量组 ($P<0.05$)。在相同采样时间点, 蟹血清 POD 活性随处理剂量的升高而增强, 高剂量 (25 $\mu\text{g/kg}$) 处理组的免疫增强效果显著优于中、低剂量处理组 ($P<0.05$)。由图 4 可知, 在注射 3 种剂

量 ODN-R 后的第 1 天、3 天、5 天、8 天时,实验蟹血清的 POD 活性均有所升高,但是与对照组及生理盐水注射组相比均无显著性差异 ($P>0.05$)。此外,

在相同采样时间点,注射 3 种剂量处理之间也没有显著性差异 ($P>0.05$)。

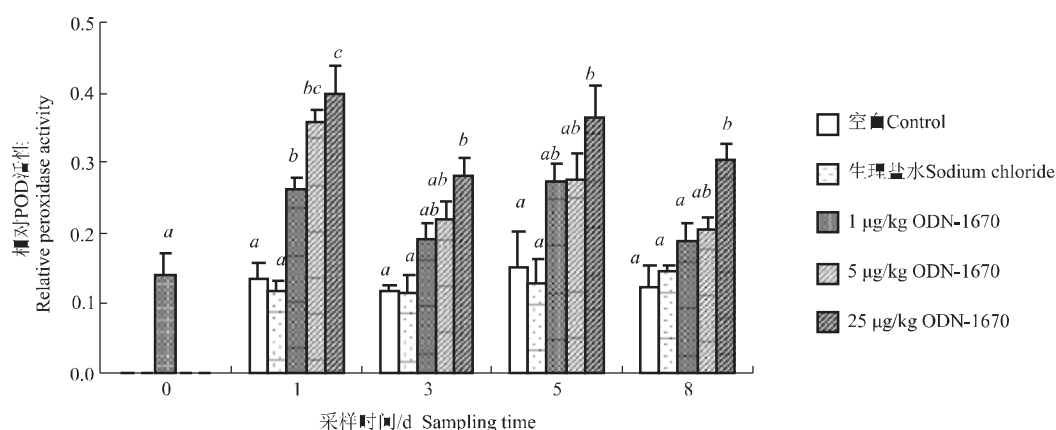


图 3 ODN-1670 对中华绒螯蟹血清过氧化物酶 (POD) 相对活性的影响

注: 1. 柱及短线表示每个处理组的平均数及标准误; 2. 柱上不同字母表示同一采样时间各处理组之间差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 3 Effects of ODN-1670 on the relative activity of serum peroxidase of *Eriocheir sinensis*

Note: 1 Each bar represents mean value with standard error of each treatment; 2. data at the same sampling time with different letters are significantly different from each other.

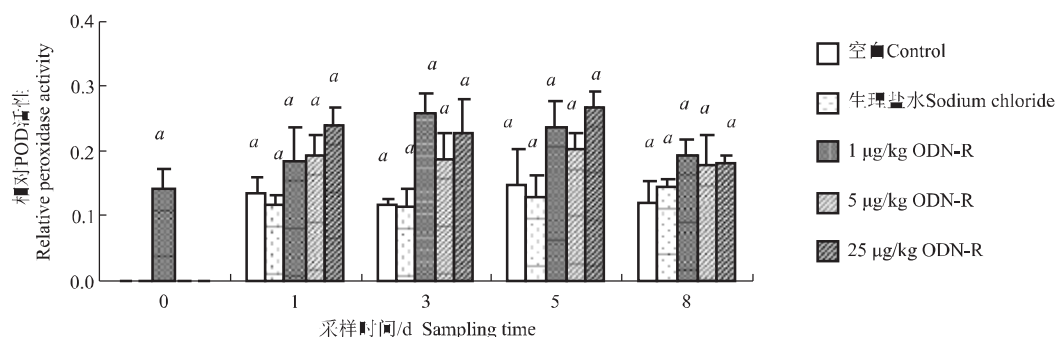


图 4 ODN-R 对中华绒螯蟹血清过氧化物酶 (POD) 相对活性的影响

注: 1. 柱及短线表示每个处理组的平均数及标准误; 2. 柱上相同字母表示同一采样时间各处理组之间差异不显著 ($P>0.05$)。

Fig. 4 Effects of ODN-R on the relative activity of serum peroxidase of *Eriocheir sinensis*

Note: 1 Each bar represents mean value with standard error of each treatment; 2. data at the same sampling time with same letters are not significantly different ($P>0.05$) from each other.

2.3 CpG-ODNs对中华绒螯蟹血清超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

2 种 CpG-ODNs 对中华绒螯蟹血清 SOD 活性的影响如图 5、6 所示。由图 5 可见, 注射 ODN-1670 后第 1 天, 3 个处理组 SOD 活性均显著高于对照及生理盐水注射组 ($P<0.05$); 第 3 天时活性有所下降; 第 5 天低、中剂量组活性比第 3 天有所上升, 且中剂量 5 µg/kg 组 SOD 活性显著高于对照及生理盐水组 ($P<0.05$); 第 8 天中、高剂量组仍

然显著高于对照和生理盐水组 ($P<0.05$), 低剂量组 SOD 活性显著高于对照组 ($P<0.05$)。结果还显示, 第 1 天、3 天、8 天, 随着注射剂量的增加, 蟹的 SOD 活性显著增强 ($P<0.05$)。由图 6 可见, 对实验蟹注射 ODN-R 第 1 天、3 天、8 天, 3 种剂量处理组血清 SOD 活性均略有增强, 但是与对照及生理盐水组相比, 均没有显著差异 ($P>0.05$)。此外, 在相同采样时间点, 3 种剂量处理组之间也不存在显著差异 ($P>0.05$)。

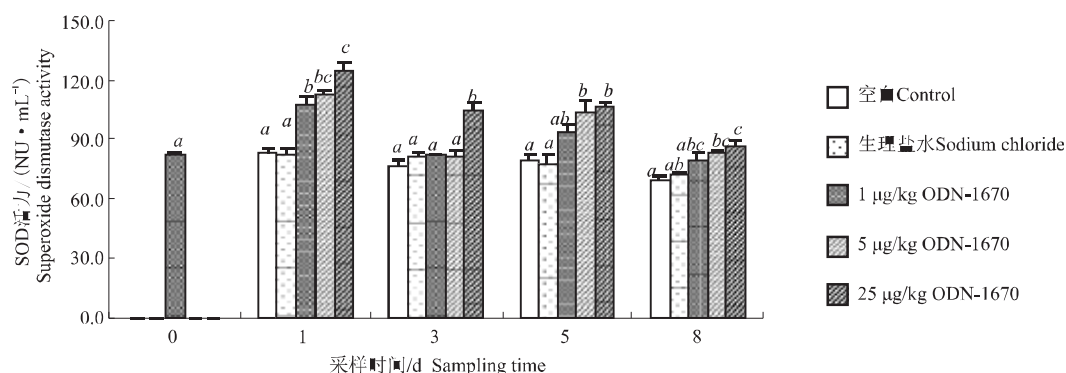


图5 ODN-1670 对中华绒螯蟹血清 SOD 酶活性的影响

注: 1. 柱及短横线表示每个处理组的平均数及标准误; 2. 柱上不同字母表示同一采样时间各处理组之间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.5 Effects of ODN-1670 on the serum superoxide dismutase activity of *Eriocheir sinensis*

Note: 1. Each bar represents mean value with standard error of each treatment; 2. data at the same sampling time with different letters are significantly different ($P < 0.05$) from each other.

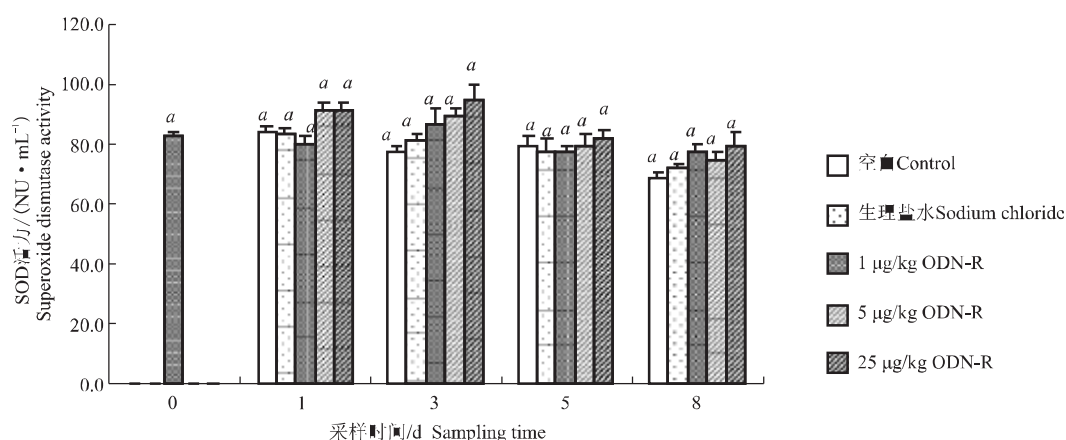


图6 ODN-R 对中华绒螯蟹血清 SOD 酶活性的影响

注: 1. 柱及短横线表示每个处理组的平均数及标准误; 2. 柱上相同字母表示同一采样时间各处理组之间差异不显著 ($P > 0.05$).

Fig. 6 Effects of ODN-R on the serum superoxide dismutase (SOD) activity of *Eriocheir sinensis*

Note: 1. Each bar represents mean value with standard error of each treatment; 2. data at the same sampling time with same letters are not significantly different ($P > 0.05$) from each other.

3 讨论

3.1 CpG-ODNs对中华绒螯蟹血细胞呼吸爆发活性的影响

甲壳动物缺乏像脊椎动物一样的由免疫球蛋白介导的特异性免疫, 血细胞在非特异性免疫防御反应中起着主要作用。Meng 等^[14]报道, CpG-ODNs 可增强草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 巨噬细胞产生 O_2^- 和过氧化氢 (H_2O_2) 的能力, 并能使血清 ACP 活性和杀菌活性增加。Tassakka

等^[15]以 $0.1 \mu\text{g}/\text{尾}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{尾}$ 和 $10 \mu\text{g}/\text{尾}$ 的剂量对鲤 (*Cyprinus carpio*) 进行腹腔注射 CpG-ODNs 后发现, ODN-B (GCTAGACGTTAACGTT) 和 ODN-C (ATCGACTCTCGAACGTTCTC) 均能激活鲤巨噬细胞, 使其超氧阴离子产量和吞噬活性提高。本研究表明, ODN-1670 对中华绒螯蟹血细胞超氧阴离子产量的影响与 CpG-ODN 对鲤巨噬细胞超氧阴离子产量的影响结果相一致。此外, 含反向 CpG (即 GpC) 的 ODN-R 对中华绒螯蟹血细胞

超氧阴离子的产生虽有一定的促进作用,但与空白对照组和生理盐水注射组相比,没有显著差异 ($P>0.05$)。

3.2 CpG-ODNs对中华绒螯蟹血清POD活性的影响

过氧化物酶 (POD) 参与多种生理代谢反应,尤其是在清除自由基、防止生物分子损伤方面有着十分重要的作用^[16]。刘树青等^[17]发现,注射 1.0% 北虫草多糖及 1.0% 海藻多糖 48 h 可使中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血清中 POD 活性由对照组的 0.11 U/mg 分别增至 2.2 U/mg 和 1.96 U/mg。目前还未见有关于 CpG-ODNs 对于甲壳动物血清过氧化物酶 (POD) 影响的报道。本实验注射 ODN-1670 后,第 1 天 3 种剂量处理组的血清 POD 活性均较生理盐水注射组和空白对照组显著升高,高剂量 25 $\mu\text{g/kg}$ 组的增强效果显著优于中、低剂量 2 组。实验进行至第 3 天时各组 POD 活性均有所下降而第 5 天时又有所回升。出现这种现象的原因,可能是由于第 1 天血细胞超氧阴离子产量显著增加造成的。注射 ODN-R 虽可使 POD 活性有所升高,但是与空白对照及生理盐水组相比,均无显著性差异 ($P>0.05$)。

3.3 CpG-ODNs对中华绒螯蟹血清SOD活性的影响

超氧化物歧化酶 (SOD) 活性与生物的免疫水平密切相关,常被用作衡量甲壳动物免疫状态的重要指标。沈锦玉等^[18]发现注射海带多糖和灭活菌苗可以使得中华绒螯蟹 SOD 活性极显著高于对照组;投喂灭活菌苗和壳聚糖组蟹 SOD 活性显著提高,同时海带多糖投喂组蟹的 SOD 活性极显著增强。张明等^[19]研究发现,在注射脂多糖 (LPS) 和弧菌刺激后的一定时间内对中国明对虾 SOD 的活性有一定的刺激作用。有研究表明, SOD 的活化依赖于细胞总数 (THC) 和透明细胞 (HC) 的增加从而使清除超氧阴离子的能力增强^[20]。本次实验注射 ODN-1670 后蟹血清 SOD 活性的变化规律进一步证实了这一点,第 1 天超氧阴离子的显著增加诱导 SOD 活性立即显著增强;随着血细胞呼吸爆发活性的减弱,第 3 天时 SOD 活性有所下降;第 5 天由于血细胞 THC 和 HC 的增加 (数据未发表) SOD 活性再次回升。因此,3 种剂量 ODN-1670 处理均可以显著增强实验蟹血清的 SOD 活性。

笔者以前的研究表明^[11],注射 CpG-ODNs 可以通过增强中华绒螯蟹 3 种血清酶 LSZ、ACP、ALP 的活性来调节中华绒螯蟹的免疫功能。而本

次实验结果表明,体内注射 CpG-ODNs 可以显著增强中华绒螯蟹血细胞呼吸爆发活性及其血清 SOD、POD 活性,为新型免疫增强剂 CpG-ODNs 在水产动物养殖中的应用提供了理论支持。

参考文献:

- [1] 王成桂,梁道栋. 中草药免疫增强剂治疗南美白对虾“死底症”的试验[J]. 中国水产,2007(5): 68-69.
- [2] 郑永标,江枝和. 868 细菌多糖类提取物对甲鱼抗体产生的影响[J]. 水产科学,2000,19(6): 12-13.
- [3] 刘岩,江晓路. 聚甘露糖醛酸对中国对虾免疫相关酶活性的溶菌溶血活性的影响[J]. 水产学报,2000,24(6): 549-553.
- [4] 刘恒,李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖沼,1998,29(2): 113-118.
- [5] Jørgensen J B, Johansen A, Stenersen B, et al. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity[J]. Dev Comp Immunol,2001,25: 313-321.
- [6] Jørgensen J B, Zou J, Johansen A, et al. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1h and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism[J]. Fish Shellfish Immunol, 2001,11: 673-682.
- [7] Bauer S, Kirschning C J, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species specific CpG motif recognition[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98: 9 237-9 242.
- [8] Takeshita F, Leifer C A, Gursel I, et al. Cutting edge: role of toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells[J]. J Immunol,2001,167: 3 555-3 558.
- [9] Oumouna M, Jaso-Friedmann L, Evans D L. Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA: binding, specificity and identification of unique immunostimulatory motifs[J]. Dev Comp Immunol,2002,26: 257-269.
- [10] Chuo C P, Liang S M, Sung H H. Signal transduction of the prophenoloxidase activating system of prawn haemocytes triggered by CpG oligodeoxynucleotides[J]. Fish shellfish Immunol,2005,18: 149-162.
- [11] 李红霞,李义,刘永贵,等. CpG 寡脱氧核苷酸对中华绒螯蟹 3 种血清酶活性的影响[J]. 饲料工业,2007,39(1):

- 252-257.
- [12] Song Y L, Hsieh Y T. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species[J]. Dev Comp Immunol, 1994, 18: 201-209.
- [13] 史成银, 黄健, 宋晓玲. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的 ELISA 快速检测 [J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 116-118.
- [14] Meng Z, Shao J Z, Xiang L X. CpG oligodeoxynucleotides activate grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) macrophages[J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27: 313-321.
- [15] Tassakka A C M A R, Sakai M. Current research on the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides in fish[J]. Aquaculture, 2005, 246: 23-36.
- [16] Simon L, Fetrat M Z, Jones D E, et al. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *phaseolus vulgaris* [J]. Biochem Physiol, 1974, 166: 387-392.
- [17] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278-283.
- [18] 沈锦玉, 刘问, 曹铮, 等. 免疫增强剂对中华绒螯蟹免疫功能的影响 [J]. 浙江农业学报, 2004, 16(1): 25-29.
- [19] 张明, 王雷, 郭振宇, 等. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响 [J]. 海洋科学, 2004, 28(7): 22-25.
- [20] Cheng W, Liu C H, Yeh S T, et al. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17: 41-51.

Effects of CpG-ODNs on innate immune activities of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*

LI Hong-xia^{1,2}, LI Yi², YU Ju-hua¹, XU Pao¹

(1. Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

Abstract: Animals immune function could be stimulated by both bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides (ODN) containing unmethylated CpG dinucleotides motifs. Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* were injected with ODN-1670 (containing 1 CpG motif) and ODN-R (containing 1 inverted CpG motif, GpC) through coelom by dose of 1, 5, 25 $\mu\text{g/kg}$ body weight. At the same time, one group injected with 0.1 mL saline and another blank group which was not administrated were set as controls. The activities of respiratory burst (release of superoxide anion), peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) of serum were measured at 0, 1, 3, 5, and 8 days after administration of CpG-ODNs. The results demonstrated that intrathecal injection of 25 $\mu\text{g/kg}$ ODN-1670 was shown to significantly potentiate the respiratory burst activity of haemocytes ($P < 0.05$). Serum peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) activities significantly increased compared with the controls in the ODN-1670 treatment groups of 1, 5, 25 $\mu\text{g/kg}$ body weight during the experiment period after intrathecal injection ($P < 0.05$). And no significant difference on the parameters was detected after the administration of ODN-R ($P > 0.05$). Therefore, the present results indicate that ODN-1670 can enhance the non-specific immune response and resistance to potential infection to *E. sinensis*. So it is a potential new type of immunostimulant for *E. sinensis*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 801-807]

Key words: *Eriocheir sinensis*; CpG-ODN; respiratory burst; peroxidase; superoxide dismutase

Corresponding author: LI Yi. E-mail: ly5980@sina.com.cn