

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14292

大黄多糖对拟穴青蟹免疫相关基因表达的影响

文英, 曹劲松, 张泽蕙, 钟名其, 陈洁辉, 章跃陵

汕头大学 理学院 生物学系 海洋生物研究所, 广东 汕头 515063

摘要: 运用 RT-PCR 技术探索拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)注射免疫增强剂——大黄多糖(rhubarb polysaccharide, RP)后 11 个免疫相关基因的表达变化情况。结果发现, 大黄多糖刺激拟穴青蟹 4 d 后, 血细胞中 4 个基因(丝氨酸蛋白酶抑制因子、过氧化氢酶、过氧化物还原酶和酚氧化酶原)表达水平分别上调 1.1 倍、4.1 倍、1.3 倍和 2.1 倍, 与对照组相比, 存在极显著($P<0.01$)或显著性差异($P<0.05$)。肝胰腺中 5 个基因表达变化显著($P<0.05$), 其中丝氨酸蛋白酶抑制因子、过氧化物还原酶和抗脂多糖因子 3 个基因表达分别上调 2.1 倍、4.8 倍和 1.7 倍; 过氧化氢酶和溶菌酶仅在实验组中表达, 未见其在对照组表达。由此推测, 丝氨酸蛋白酶抑制因子、过氧化氢酶、过氧化物还原酶、酚氧化酶原、抗脂多糖因子和溶菌酶 6 个基因可能与拟穴青蟹免疫增强有关。

关键词: 拟穴青蟹; 大黄多糖; RT-PCR; 免疫增强相关基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)03-0387-06

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)因具有生长快、适应性强、肉味鲜美、营养价值高等特点, 目前已发展成为我国水产养殖的一个重要分支。然而近年来, 拟穴青蟹养殖业由于受到来自病毒、细菌、寄生虫等传染性疾病的威胁而严重减产^[1-2]。研究发现, 免疫增强剂作用于蟹类后可以有效提高其免疫力和抗病力, 被认为是防控蟹类病害的有效措施之一^[3-7]。例如, Sui 等^[4]发现 β -聚羟基丁酸酯能够显著增强中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)幼虫对致病性鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)的抗菌能力。Lin 等^[6]研究表明锯缘青蟹(*Scylla paramamosain*)注射 β -葡聚糖或肽聚糖后, 其血细胞中铜锌超氧化物歧化酶(*ecCuZnSOD*)基因表达水平显著提高。Liu 等^[7]报道脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激锯缘青蟹后, 其抗氧化酶基因(*SpCAT*)和超氧化物歧化酶的表达水平可发生明显升高。潘清清^[8]证实大黄多糖(rhubarb polysaccharides,

RP)可显著提高锯缘青蟹血淋巴酚氧化酶(phenoxodase, PO)活力, 且最佳激活浓度为 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 。崔青曼等^[9]研究发现, 采用大黄、黄芪、连翘及海藻多糖等研制成的河蟹(*Eriocheir sinensis*)复方饲料添加剂, 能显著提高河蟹血细胞吞噬活性、血清杀菌活力和凝集效价, 并极大地增强河蟹机体免疫功能。本课题组前期研究发现, 大黄多糖免疫刺激拟穴青蟹 4 d 后, 血清中酚氧化酶(phenoloxidase, PO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、溶菌酶(lysozyme, Lys)、酸性磷酸酶(acid phosphates, ACP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)等非特异性指标活力均显著提高^[10]。然而, 迄今为止, 拟穴青蟹免疫增强的分子机理尚不清楚, 还有待于进一步研究。为此, 采取 RT-PCR 策略探索其免疫增强相关基因, 对揭示拟穴青蟹免疫增强分子机制, 建立新的免疫增强剂筛选体系, 促进

收稿日期: 2014-07-10; 修订日期: 2014-09-26.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372558); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0922); 广东省自然科学基金项目(S2013010015190); 广东省高等学校科技创新重点项目(2012CXZD0025); 广东省高等学校高层次人才项目(2011).

作者简介: 文英(1989-), 女, 硕士生, 主要从事海洋动物分子免疫研究. E-mail: 12ywen@stu.edu.cn

通信作者: 章跃陵(1971-), 教授, 博士生导师. E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

拟穴青蟹养殖业的健康、持续发展等具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要材料

拟穴青蟹购自汕头市华勋水产有限公司牛田洋基地, 均重(115±23) g, 实验前于水槽中驯养 1 周。大黄购自汕头市鮑浦凯德连锁大药房。

1.2 方法

1.2.1 大黄多糖的制备 按潘清清^[8]报道的方法, 取 100 g 大黄 50℃ 烘干, 加无菌蒸馏水 500 mL, 4℃ 浸泡过夜; 煎煮 30 min, 加水 2 次, 每次加 250 mL, 再煎煮 30 min, 将 3 次煮出的药液进一步煎煮浓缩至 100 mL, 过滤取滤液。加 3 倍体积无水乙醇, 静置 4 h, 室温 8 000 r/min 离心 15 min, 褐色沉淀即为多糖粗品。紧接着重复溶解、醇提 2~3 次, 获得多糖制品。冷冻干燥 24 h 后加无菌蒸馏水溶解沉淀, 室温 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 按 GB/T 9695.31—91 方法进行糖含量测定, 4℃ 保存备用。

1.2.2 拟穴青蟹免疫刺激 按潘清清^[8]报道的方法, 将暂养后的拟穴青蟹随机分为实验组和对照组, 每组 5 只, 实验组按本课题组已报道的最佳剂量^[10]注射制备好的大黄多糖溶液, 对照组注射等体积的 0.85% 生理盐水, 注射剂量为最佳激活浓度(大黄多糖最佳激活浓度为 1.25×10^{-4} μg/mL)×30% 拟穴青蟹均重/现有中草药多糖的浓度。

1.2.3 RNA 提取与 cDNA 合成 免疫刺激 4 d 后, 选用 Trizol 方法(TaKaRa, Japan)提取实验所需组织(肝胰腺和血细胞)总 RNA, DNase I (Rnase Free) 去除 DNA, 紫外分光光度法测定浓度, 琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 完整性。继而选用 PrimeScriptTM RT-PCR Kit (TaKaRa, Japan)将 RNA 合成 cDNA, -20℃ 保存, 备用。

1.2.4 引物设计 通过 NCBI 搜索和参考青蟹免疫相关文献[11—12], 选定 11 个免疫相关基因: 金属硫蛋白(*Met*, FJ774671.1)、丝氨酸蛋白酶抑制因子(*Spi*, FJ774918.1)、溶菌酶(*Lys*, HQ158762.1)、

甲壳素(*Cru*, EU161287.1)、过氧化氢酶(*Cat*, GQ892832.1)、过氧化物还原酶(*Per*, FJ429110.1)、酚氧化酶原(*Pro*, DQ435606.1)、抗脂多糖因子(*Alf*, FJ013272.1)、锯缘青蟹阴离子抗菌肽(*Scy2*, EF555444.1)和丝氨酸激酶(*Sek*, AAX47960.1)和细胞黏附蛋白(*per*, EU599182.1), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物(表 1)。

表 1 拟穴青蟹免疫相关基因引物
Tab. 1 Nucleotide primers of immunerelated genes in *Scylla paramamosain*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
Scy2-F	CGGTAAAGGACTATTGGTT
Scy2-R	ATTGTGAGGGTCTGAAGG
per-F	CACAGTTCACCTCCTCCGTTAT
per-R	GTCAAGCCAGGTTGCTCATT
Sek-F	GCTCGGCAAGTCTTTATCC
Sek-R	TGTTGAGTCAGGTCCAGTGTTT
Pro-F	ATCGGGAGAACCTTGGAGTC
Pro-R	GCTATGTTGCTGAGGCGTGT
Alf-F	CAAGGCACCACAAAGAGG
Alf-R	TACAGGCACATCACCACC
Lys-F	TGCCATCAACCACCACAACCT
Lys-R	CCTTCTTTCGTAAGCAACCC
per-F	GGCAACTATCCCTCCTACAC
per-R	GCAGACCTAATACCAGCACC
Cru-F	CTTTACCAACGGCTTCTTCA
Cru-R	ACATTTACCAGGGTGCTTTC
Cat-F	CACTGACTTGCCGTGCTGTT
Cat-R	CACCTGGACTACCTTGTGCTCT
Met-F	GTCCATTCTCCCTCAACC
Met-R	ACCGTCTACCCGCTTTCC
Spi-F	CGTCTTCTTCAACGGCAAAT
Spi-R	GCAGTCCCACCCTCATCTCC
Beta-actin-F	ATCCTGCGTCTGGACTTGG
Beta-actin-R	CGGTGGTCGTGAAGGTGTAG

1.2.5 荧光定量 PCR 检测 参考本课题组既往报道的方法^[13], 将所有 cDNA 样品浓度调为一致, 以拟穴青蟹 β-肌动蛋白(β-actin)为内参, 采用 SYBR[®]Premix Ex Taq 试剂盒进行 PCR 扩增。扩增体系为 20 μL, 包含模板 cDNA 2 μL, 正反向引物各 0.4 μL (引物浓度为 10 μmol/L), 反应混合液 10 μL, 无菌水 7.2 μL。扩增条件为: 预变性 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 4 个循环; 94℃ 30 s,

57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 8 个循环; 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 16 个循环; 72℃ 延伸 10 min。每个样品设置 3 个平行, 在确认每个样品扩增反应所产生的熔解曲线为单一波峰后, 获取 Ct 值用于数据处理及分析。

1.2.6 数据处理及分析 荧光定量 PCR 所得数据按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理^[14], 采用单因素方差(SPSS 18.0)分析同一基因在实验组和对照组的表达水平, t 检验分析其相对表达差异。其中, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 拟穴青蟹血细胞免疫相关基因表达

采用 RT-PCR 技术检测大黄多糖刺激拟穴青蟹 4 d 后的血细胞中金属硫蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制因子、过氧化氢酶等 11 个免疫相关基因的表达变化情况, 结果如图 1 所示。与对照组相比, 不同基因 mRNA 表达水平的变化存在明显的差异。其中, 丝氨酸蛋白酶抑制因子、过氧化氢酶、过氧化物还原酶和酚氧化酶原 4 个基因 mRNA 表达水平显著上升, 分别上调 1.1 倍、4.1 倍、1.2 倍和 2.1 倍, 存在显著性差异($P < 0.05$)或极显著性差异($P < 0.01$); 金属硫蛋白和甲壳素、抗脂多糖因子等 3 个基因表达水平变化幅度较小, 不存在显著性差异; 其他 4 个基因在血细胞中未见其表达(图未列出)。

2.2 拟穴青蟹肝胰腺免疫相关基因表达

在此基础上, 进一步对上述 11 个基因在肝胰腺中的表达变化情况进行检测, 结果如图 2 所示。不同基因在肝胰腺中的表达变化同样存在较大差距, 其中丝氨酸蛋白酶抑制因子、过氧化物还原酶、抗脂多糖因子 3 个基因表达水平分别上调 2.1 倍、4.8 倍、1.7 倍, 与对照组相比, 存在显著性差异($P < 0.05$)或极显著性差异($P < 0.01$); 过氧化氢酶和溶菌酶 2 个基因在对照组中未见其表达, 但在实验组中表达明显; 金属硫蛋白和甲壳素 2 个基因在对照组与实验组之间表达变化不显著; 其他 4 个基因在实验组和对照组中均未见其表达(图未列出)。

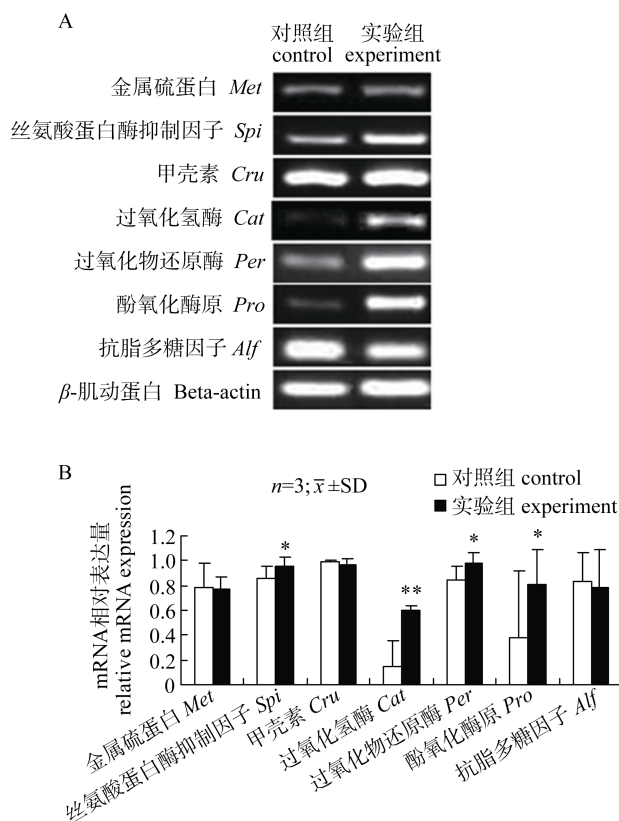


图 1 大黄多糖刺激对拟穴青蟹血细胞中免疫相关基因表达水平的影响

A. 不同基因 RT-PCR 分析图; B. 不同基因相对表达量的灰度值。*表示实验组和对照组间存在显著性差异($P < 0.05$); **表示极显著性差异($P < 0.01$)。

Fig. 1 Analysis of mRNA expression level of different immune related genes in hemocytes of *Scylla paramamosain* after treatment with Rhubarb polysaccharides

A. RT-PCR analysis of different genes; B. The gray value of different genes expression.

Significant or extremely significant differences between the experimental and the control group of each gene were indicated with one ($P < 0.05$) or two ($P < 0.01$) asterisks

3 讨论

本课题组前期采用蛋白质组学与荧光定量 RT-PCR 相结合的策略研究发现, 大黄多糖刺激拟穴青蟹后, 能引起血细胞和肝胰腺中糜蛋白酶、假血蓝蛋白、C 型凝集素、铁蛋白和血蓝蛋白 5 种蛋白在蛋白质及 mRNA 表达水平的大幅度上升或下降, 推测这些变化可能与拟穴青蟹免疫增强有关^[10]。但由于蛋白质组学技术所固有的缺陷(如目前尚未获得拟穴青蟹全基因组序列导致

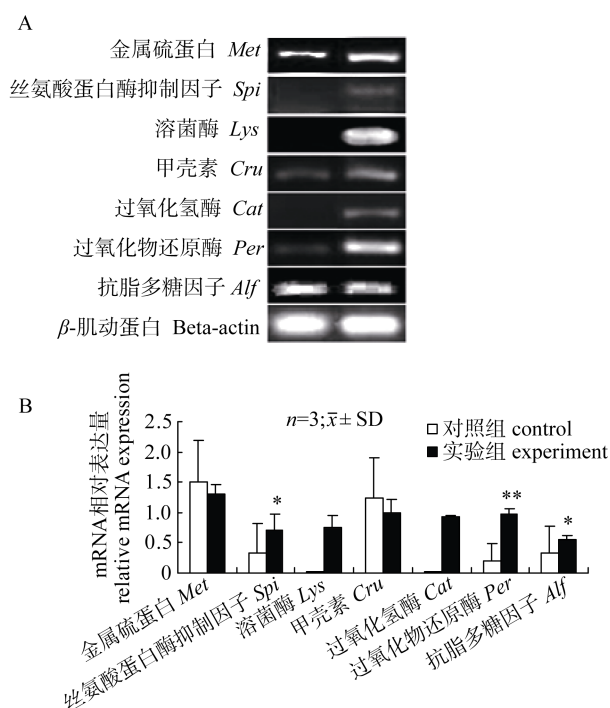


图 2 大黄多糖刺激对拟穴青蟹肝胰腺中免疫相关基因表达水平的影响

A. 不同基因 RT-PCR 分析图; B. 不同基因相对表达量的灰度值。
*和**分别表示实验组和对照组间存在显著性差异($P < 0.05$)
和极显著性差异($P < 0.01$)。

Fig. 2 Analysis of mRNA expression level of different immune related genes in hepatopancreas of *Scylla paramamosain* after treatment with Rhubarb polysaccharides

A. RT-PCR analysis of different genes; B. The gray value of different genes expression.

Significant or extremely significant differences between the experimental and the control group of each gene were indicated with one ($P < 0.05$) or two ($P < 0.01$) asterisks.

其蛋白质数据库还不够完善,特异性蛋白鉴定率较低等)致使拟穴青蟹免疫增强基因的研究还不够深入。为此,本研究在此基础上,进一步采用荧光定量 PCR 策略分析大黄多糖刺激对拟穴青蟹 11 个免疫相关基因 mRNA 表达水平的影响。我们发现大黄多糖刺激拟穴青蟹后不同基因可以发生不同程度的响应。其中,血细胞或肝胰腺中的丝氨酸蛋白酶抑制因子、溶菌酶、过氧化氢酶、过氧化物还原酶、酚氧化酶原和抗脂多糖因子这 6 个基因表达水平显著上调,提示这些变化可能同样与拟穴青蟹免疫增强相关。至于为何该 6 个基因在本课题组前期的蛋白质组学研究中未能发现,可能与两种研究方法的差异有关,也可能是大黄

多糖刺激拟穴青蟹后这些基因在蛋白质、mRNA 水平的响应程度不同所致。

大量研究证实,本研究中所发现的 6 个表达上调基因在无脊椎动物先天免疫中发挥重要的免疫防御功能。例如, Umasuthan 等^[15]报道条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Protease nexin-1) 具有抗蛋白酶和抗凝血分子等免疫学活性; Wang 等^[16]发现凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 被哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 刺激感染 36 h 后,其血淋巴中溶菌酶基因的表达量显著升高,推测与非特异性免疫防御相关; Arockiaraj 等^[17]研究发现,罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 被皮下及造血组织坏死病毒 (hypodermal and hematopoietic necrosis virus) 刺激后,其消化道中的过氧化氢酶基因表达明显上调; Zhang 等^[18]的研究表明,中国明对虾 (*Penaeus chinensis*) 被溶藻酸弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 刺激 37 h 后,其肝胰腺和血细胞中的过氧化物还原酶 mRNA 表达水平大幅度上升; 孙杰等^[19]报道,中国明对虾在被鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 和对虾白斑病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 感染后,其酚氧化酶原基因 (*FCproPO*) 在肝胰腺中的表达量显著增加。Liu 等^[20]报道,拟穴青蟹抗脂多糖因子不仅对大多数革兰氏阳性、阴性菌具有抗菌作用,而且对白斑综合征病毒也具有强烈的抗病毒效力。结合本研究发现的这些基因在拟穴青蟹免疫增强后 mRNA 表达水平明显上升的研究结果,推测丝氨酸蛋白酶抑制因子、过氧化氢酶、过氧化物还原酶等 6 个基因同样与拟穴青蟹免疫增强有关,可能为新的拟穴青蟹免疫增强相关基因。

综上所述,本研究在本课题组既往研究基础之上,进一步发现大黄多糖刺激拟穴青蟹后,其丝氨酸蛋白酶抑制因子、过氧化氢酶、过氧化物还原酶等 6 个基因表达水平显著上升,提示其可能为拟穴青蟹免疫增强相关基因。所获研究结果为揭示拟穴青蟹免疫增强的分子机制提供了新的思路,有利于促进拟穴青蟹养殖业的健康、持续发展。

参考文献:

- [1] Wang W. Bacterial diseases of crabs: A review[J]. J Invertebr Pathol, 2011, 106: 18–26.
- [2] Bonami J R, Zhang S Y. Viral diseases in commercially exploited crabs: A review[J]. J Invertebr Pathol, 2011, 106: 6–17.
- [3] Yu Q Y. Studies on the preparation, antioxidant activities of polysaccharides from the shoots of *Polydora edulis* and its immune effect on *Eriocheir sinensis*[D]. Suzhou: Suzhou University, 2013: 1–85.[俞全宇. 竹笋多糖的制备、抗氧化活性及对中华绒螯蟹的免疫效应研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013: 1–85.]
- [4] Sui L, Cai J, Sun H, et al. Effect of poly-hydroxybutyrate on Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, larvae challenged with pathogenic *Vibrio anguillarum*[J]. J Fish Dis, 2012, 35: 359–364.
- [5] Li Y, Liu Y G, Wang Y, et al. Effect of microencapsulated vaccine of *Aeromonas hydrophila* on immune factors of Chinese mitten crab[J]. Cereal Feed Industry, 2011, (4): 14–17.[李义, 刘永贵, 王玥, 等. 嗜水气单胞菌微胶囊疫苗对中华绒螯蟹免疫因子的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2011, (4): 14–17.]
- [6] Lin Y C, Vaseeharan B, Chen J C. Identification of the extracellular copper-zinc superoxide dismutase (ecCuZnSOD) gene of the mud crab *Scylla serrata* and its expression following β -glucan and peptidoglycan injections[J]. Mol Immunol, 2008, 45: 1346–1355.
- [7] Liu H P, Chen F Y, Gopalakrishnan S, et al. Antioxidant enzymes from the crab *Scylla paramamosain*: gene cloning and gene protein expression profiles against LPS challenge[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28: 862–871.
- [8] Pan Q Q. Screening and application of immune stimulants in disease control for cultivated mud crab, *Scylla serrata*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008: 1–61.[潘清清. 锯缘青蟹免疫增强剂的筛选及在病害防控中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008: 1–61.]
- [9] Cui Q M, Zhang Y H, Yuan C Y, et al. Studies on the immunity improvement of crab *Eriocheir sinensis* stimulated with Chinese medicinal herb and polysaccharides compound additive[J]. Journal of Hydroecology, 2001, 21(4): 40–41.[崔青曼, 张耀红, 袁春营, 等. 中草药、多糖复方添加剂提高河蟹机体免疫力的研究[J]. 水利渔业, 2001, 21(4): 40–41.]
- [10] Cao J S, Wang Z H, Zhang Y L, et al. Identification and characterization of the related immune-enhancing proteins in crab *Scylla paramamosain* stimulated with rhubarb polysaccharides[J]. Mol Immunol, 2014, 57: 263–273.
- [11] Yue F, Pan L Q, Xie P, et al. Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress[J]. Comp Biochem Phys A, 2010, 157: 246–251.
- [12] Wang Y C, Chang P S, Chen H Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(6): 1161–1177.
- [13] Cao J S, Lin Z Y, Zhang Y L, et al. Cloning and characterization of the SpLRR cDNA from green mud crab, *Scylla paramamosain*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34: 129–135.
- [14] Zhang S Y, Jouanguy E, Ugolini S, et al. TLR3 Deficiency in patients with herpes simplex encephalitis[J]. Science, 2007, 317: 1522–1527.
- [15] Umasuthan N, Whang I, Kim J O, et al. Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) serpin, protease nexin-1: Transcriptional analysis and characterization of its antiprotease and anticoagulant activities[J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35: 785–798.
- [16] Wang K H, Tseng C W, Lin H Y, et al. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*[J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(1): 49–58.
- [17] Arockiaraj J, Easwaran S, Vanaraja P, et al. Molecular cloning, characterization and gene expression of an antioxidant enzyme catalase (MrCat) from *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32: 670–682.
- [18] Zhang Q L, Li F H, Zhang J Q, et al. Molecular cloning, expression of aperoxiredoxin gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the antioxidant activity of its recombinant protein[J]. Mol Immunol, 2007, 44(14): 3501–3509.
- [19] Sun J, Wang B J, Li X H, et al. The full length cDNA cloning and expression profile of prophenoloxidase of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(1): 56–66.[孙杰, 王宝杰, 李晓华, 等. 中国明对虾酚氧化酶原基因 cDNA 的克隆与表达特征[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 56–66.]
- [20] Liu H P, Chen R Y, Zhang Q X, et al. Characterization of two isoforms of antilipopolysaccharide factors (Sp-ALFs) from the mud crab *Scylla paramamosain*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33: 1–10.

The effect of immune enhancement-related genes in mud crab, *Scylla paramamosain*, stimulated with rhubarb polysaccharides

WEN Ying, CAO Jinsong, ZHANG Zehui, ZHONG Mingqi, CHEN Jiehui, ZHANG Yueling

Department of Biology and Marine Biology Institute, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China

Abstract: The mud crab (*Scylla paramamosain*) is widely cultured on the southeast coast of China. Unfortunately, the crab industry has suffered significant economic losses in the past 10 years due to viral, bacterial, and parasitic diseases. Researchers have suggested that using immunostimulants would help establish a crab disease control strategy. However, little information on immune-enhancing proteins in crabs is available. In this study, a quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was carried out to investigate whether 11 reported genes, including metallothionein (*Met*), serine protease inhibitor (*Spi*), lysozyme (*Lys*), crustin (*Cru*), catalase (*Cat*), peroxide reductase (*Per*), prophenoloxidase (*Pro*), anti-lipopolysaccharide factor (*Alf*), *Scylla serrata* anti-microbial Scy2 precursor, serine proteinase (*Sek*), and peroxinectin (*Per*) are associated with enhancing immunity in *S. paramamosain* treated with rhubarb polysaccharides for 4 days. The results indicate that the mean hemocyte mRNA expression values of *Spi*, *Cat*, *Per*, and *Pro* increased about 1.1-, 4.1-, 1.2-, and 2.1-fold, respectively. At the same time, the *Spi*, *Cat*, *Per*, *Lys*, and *Alf* genes in the hepatopancreas were significantly upregulated. Of these, *Spi*, *Per*, and *Alf* were upregulated 2.1-, 4.8-, and 1.7-fold, respectively. The *Lys* and *Cat* genes were only expressed in the experimental group. This result was different from our previous findings that five related immune-enhancing proteins, including hemocyanin, chymotrypsin, cryptocyanin, C-type lectin receptor, and ferritin protein, were identified in *S. paramamosain* using proteomic and RT-PCR strategies. The discrepancy probably reflects differences between the two research approaches or an unidentified post-transcriptional mechanism in these related immune-enhancing proteins. Considering recent evidence that the *Spi*, *Cat*, *Per*, *Pro*, *Lys*, and *Alf* genes play significant roles in invertebrate immune defense, it seems likely that these six significantly upregulated genes in hemocytes and hepatopancreas may be related to enhancing the crab's immune response. These results will help reveal the immune enhancement mechanism in *S. paramamosain* and will be important for immunological prevention of crab diseases.

Key words: *Scylla paramamosain*; rhubarb polysaccharide; RT-PCR; immune enhancement-related gene

Corresponding author: ZHANG Yueling. E-mail: zhangyl@stu.edu.cn