

# Immunoregulatory Characteristics of Four Novel Synthetic CpG Oligodeoxynucleotides for Freshwater Giant Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

Hung-Hung Sung\*, Yin-Han Yang, Wei-Xuan Lai

Department of Microbiology, Soochow University, Taipei Taiwan  
Email: \*hhsung@scu.edu.tw

Received: Dec. 4<sup>th</sup>, 2017; accepted: Dec. 19<sup>th</sup>, 2017; published: Dec. 29<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

Different sequences of CpG oligodeoxynucleotides (CpG-ODNs) have been demonstrated to result in different expressions of prophenoloxidase gene (*propo*) in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). In this study, in order to assess the possible applications of CpG-ODNs with different immunomodulatory effects that may be used in aquaculture, four novel CpG-ODNs (ODN3006, ODN4006, ODN2050 and ODN2051), which have been designed according to the different sequences of CpG-ODNs that promote or inhibit human and fish immunity, are used to determine their effect on prawn immunity. First, the binding rate of ODN to hemocytes analyzed by flow cytometry showed that the lowest concentration of ODN2005 required to bind 50% hemocytes (BC<sub>50</sub>) was at 1.88 µg/mL and that the concentration was at 5 µg/mL of ODN2050; it could bind more than 90% hemocytes. After hemocytes treated with different concentrations of ODN *in vitro*, all four ODNs shown increase the extracellular total PO activity (PO<sub>T</sub>) secreted from hemocytes, ODN2050 at 0.67 µg/mL which not only significantly enhanced PO<sub>T</sub> ( $p < 0.01$ ), but also had the highest activity, but ODN2051 at above 10 µg/mL also significantly increased PO<sub>T</sub>. At 1 hour after prawn was injected with ODN, the results showed that, except ODN3006 which did not affect plasma PO<sub>T</sub>, the other three ODNs all significantly increase PO<sub>T</sub> in plasma, and the highest PO<sub>T</sub> was enhanced by ODN2050, about 3.8 times more than the control group. At 3 hours after injection, the expression of four immune-related genes showed that, in comparison with the control group, both ODN2050 and ODN2051 increased the mRNA level of three PAS-related genes (*propo*, *pon* and *α2-m*); in contrast, ODN3006 decreased the mRNA level of *propo* and *pon*. As for ODN4006, there was no significant effect on the four genes. After treatment with lipopolysaccharide (LPS) for 1 day, prawns were simultaneously treated with ODN3006 and challenged by *Lactococcus garvieae*. The mortality rate of ODN-treated group was at 60% and lower than that of the untreated control group (80%). These results suggest that all four novel CpG-ODNs may play a role in regulation for the immune response of prawns; as well as, ODN2050 and ODN2051 have effects in enhancement, and ODN3006 and ODN4006 may have suppressive and neutralizing effects, respectively.

## Keywords

Novel CpG Oligodeoxynucleotides, Immune Regulation, Aquaculture Prawn,

\*通讯作者。

*Macrobrachium rosenbergii*

# 四种新型合成的CpG寡脱氧核苷酸对淡水长脚大虾的免疫调节特性

宋宏红<sup>\*</sup>, 杨茵涵, 赖伟萱

东吴大学微生物学系, 台湾 台北

Email: \*hhsung@scu.edu.tw

收稿日期: 2017年12月4日; 录用日期: 2017年12月19日; 发布日期: 2017年12月29日

## 摘要

不同序列的CpG-ODNs对淡水长脚大虾的原酚氧化酵素基因*propo*的表现具有不同的影响。为评估不同免疫调节效应之CpG-ODNs的应用可行性, 本研究使用已根据促进或抑制人类和鱼类免疫力的不同CpG-ODN序列设计之四段新的CpG-ODNs (ODN2050, ODN2051, ODN3006和ODN4006), 分析其对淡水长脚大虾(*Macrobrachium rosenbergii*)免疫力的影响。首先, 利用流式细胞仪进行ODN对血球结合率分析, 四种ODNs中, ODN2050结合50%血球所需浓度(BC<sub>50</sub>)最低(1.88 μg/mL), 且浓度5 μg/mL即可结合90%以上的血球细胞。以不同浓度ODN于体外直接处理虾血球后, 四种ODNs都能促进释出胞外之总PO活性(PO<sub>T</sub>), 其中ODN2050于0.67 μg/mL不但能明显地增强PO<sub>T</sub>且活性最高( $p < 0.01$ ); 但是ODN2051高于10 μg/mL才能明显增强PO<sub>T</sub>。虾子注射ODN后1小时, 测定血浆中PO<sub>T</sub>发现, 除ODN3006不影响PO<sub>T</sub>外, 其他三种ODNs都明显地增加PO<sub>T</sub>, 其中ODN2050促进PO<sub>T</sub>表现最强, 约无ODN处理之对照组的3.8倍。注射后3小时测定血球的4种免疫相关功能基因的表现显示, 相较于对照组, ODN2050及ODN2051明显地增加3种与原酚氧化酵素活化系统(PAS)相关之基因(*propo*、*pon*及 $\alpha 2\text{-m}$ )的mRNA表现量; 反之, ODN3006降低*propo*和*pon*的表现; 至于ODN4006则对4种基因均无明显影响。最后, 以脂多醣分子(LPS)注射刺激虾子1天后, 进行致病菌攻击并, 同时以ODN3006处理虾子, 测得ODN3006组虾子的死亡率为65%, 低于未经ODN处理组的85%。综合上述结果推测, 四段新型且合成的CpG-ODNs可能具有调节虾子免疫反应的作用, 其中的ODN2050及ODN2051为促进型, ODN3006和ODN4006可能分别为抑制型和中和型。

## 关键词

新型CpG寡脱氧核苷酸, 免疫调节, 水产养殖虾类, 淡水长脚大虾

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

甲壳类动物的防御系统以非专一性的先天性免疫为主[1], 防御系统分为体液性(humoral)与细胞性

(cellular)免疫反应。细胞性功能有吞噬作用(phagocytosis)、疖结形成(nodule formation)、包膜作用(encapsulation)、细胞毒杀作用(cytotoxicity)与原酚氧化酵素系统(prophenoloxidase-activating system, PAS)，而 PAS 被认为能引起进而增强防御系统的连锁反应[2]。先天性免疫反应为生物体防止外来入侵物的第一道防线，对于宿主而言，最大的挑战是通过有限的受体迅速识别大量不同的病原体以引发有效的防御。Janeway 于 1992 年提出[模式识别理论] (pattern recognition theory) [3]，将先天性免疫反应的防御性细胞受体或分子主要能辨识的病原体之目标分子形式称作病原相关的分子模式(Pathogen-associated molecular pattern; PAMP)，因为这些分子广泛存在于病原体表面或细胞内的各类分子，且在演化上趋于保守的[4]，如酵母细胞壁上的葡聚糖(glucan)、细菌细胞壁之脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)、多肽糖(peptidoglycan; PGN)和胞壁酸(lipoteichoic acid; LTA)、以及核酸分子如细菌的 DNA 和病毒的 RNA 等。由于这些分子不存在宿主或与宿主分子有差异，宿主可以藉由防御性识别受体，又称为模式识别受体(pattern recognition receptor; PRR)，进行“自我”和“非我”的区分[5]，如类锌受体(Toll-like receptors, TLR)。

细菌 DNA 中某些特定序列之未甲基化 CpG 寡聚脱氧核苷酸(CpG oligodeoxynucleotides; CpG-ODNs)为一种 PAMP，其通常在 5' 端有两个 purines (Pu) 及 3' 端有两个 pyrimidines (Py) 将其包围，即 5'Pu-Pu-CpG-Pyr-Pyr3' 核苷酸序列，因此种序列具有生物活性，故将其命名为 CpG 基序(CpG motif) [6] [7]。Takeshita 等人(2001)研究指出，不同序列之 CpG-ODN 对 HEK 293 细胞引起不同的反应，且不同物种能辨识的 ODN 可能有差异[8]。在鱼类，目前已有许多有关 CpG-ODN 应用的研究。CpG-ODN 能增强的免疫功能包括：巨噬细胞活性、过氧离子产量、淋巴球增生以及抵抗细菌和病毒等免疫力[9] [10] [11] [12] [13]。但是也有研究显示，有些 CpG-ODN 具有抑制效应，包括：抑制鲤鱼的肾巨噬细胞的增生[12]、无法提升金鱼(*Carassius auratus*)抗体的产量[14]、以及对大西洋鲑无明显影响等[10]。在甲壳类，本研究室是第一个证明 CpG-ODN 可以增强虾类免疫力，包括：激活虾血球的 PAS 活性、呼吸爆炸作用(respiratory burst)和血球基因 *proPO* 的表现[15] [16] [17]，且增强的 *proPO* 表现会被另一种 ODN 抑制，推测不同序列的 ODN 可能对虾免疫力具有不同效应[16]。此外，有研究发现内含多个(multi-copy) CpG 基序之质体具有增强白虾(*Litopenaeus vannamei*)抗菌力和 PO 活性[18]，以及在虾子受到白点病毒(WSSV)感染期间，CpG-ODN 可以降低病毒在血球细胞内的复制[19]。

本研究室已经根据对鱼类等具刺激或抑制效应的不同序列 CpG-ODN 进行分析并设计可能对虾血球为刺激或抑制的不同序列之 CpG-ODN。本研究将针对这些 CpG-ODNs，分别于体外直接刺激虾血球和注射处理虾子的实验，测定刺激后的酚氧化酵素(phenoloxidase, PO)活性以及四种免疫相关基因及一种呼吸相关基因的 mRNA 表现，最后利用感染实验确定这些不同序列 CpG-ODNs 对虾子防御力的影响效应属刺激性、抑制性或中和性。本研究结果将可以作为未来评估不同效应之 CpG-ODNs 应用在养殖上的参考。

## 2. 材料与方法

### 2.1. CpG 寡聚脱氧核苷酸(CpG oligonucleotides, CpG-ODN)的制备

本实验使用之不同序列的 CpG-ODN 是收集过去已发表且与鱼类有关的 30 段 ODNs 和与人类有关的 11 段 ODNs，利用 Perl 程序语言撰写的 oligo-mer 计数程序，找出这些 ODNs 序列中出现较多频率的连续 5 个核苷酸(5-mer)或 6 个核苷酸(6-mer)以 CpG 为核心的基序后，将这些序列随机组合成 21~24 个核苷酸长度的四段 CpG-ODNs，包括：ODN2050、ODN2051、ODN3006 及 ODN4006 (表 1)。此外，本实验使用已知能增强虾子免疫力的 ODN2006 [15] 以及已知对虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)为抑制性的 ODN2140 [20] 分别作为促进性和抑制性的对照组，以进行各项实验分析与比较。所有 ODN 皆委请生工有限公司(MDBio, Inc.)代为制作。于体外实验时，各种 CpG-ODN 以 M199 配制成 1、2、5、10、20、30 及 40 μg/mL

**Table 1.** Six CpG-oligonucleotides used in the study  
**表 1. 本实验所使用之六种 CpG 寡聚脱氧核苷酸**

CpG-ODN'	Sequence (5'→3')	CpG-ODN'	Sequence (5'→3')
ODN2050	GCGGC GCG CGGG CGC GCG CGC	ODN4006	TCGTCGTTT GCG TCG TTT CGTT
ODN2051	GTCGTT CCGTC GTCGT CGTT CG	ODN2006	TCGTCGTTT GTCGTTT GTCGTT
ODN3006	TCGTCGTTT GGT CGTC GCG TCG TT	ODN2014	TCGTCGTTT GCG TGC CGTT

等不同浓度；虾体实验时，以 PBS 配制成 20、30、40 及 50 μg/mL 等不同浓度。为了利于流式细胞仪的分析与观察，制备 5' 端带有羧基荧光素之琥珀酰亚胺基酯(Carboxyfluorescein-5-succimidylester)，即 5-FAM 的 ODN，简称 FAM-ODN。实验前，以磷酸盐(Phosphate buffered saline, PBS)缓冲液分别配制成不同浓度。

## 2.2. 实验用虾

购买自养殖场外观健康的淡水长臂大虾(*Macrobrachium rosenbergii*) (体重平均约 25 公克)，置于充分打气的淡水循环养殖池中，养殖密度约为每平方公尺 4~5 尾，至少驯养三天后抽血进行实验。养殖期间每日喂食人工饲料二次，饲料来自屏东科技大学郑文腾教授，配方详见 Chiu 等(2010) [21]。

## 2.3. 活血球细胞制备

以内含 0.5 mL 抗凝剂的 3.0 mL 塑料针筒搭配 24 G x1" (0.55 × 25 mm) 针头(TERUMO, Japan)，由淡水长臂大虾头胸部处，抽取血淋巴液(hemolymph)至 1.1 mL；将抗凝剂与血淋巴液迅速上下摇晃混合均匀。混合液以 300 ×g 于 4°C，离心 10 分钟；去除上清液后，加入 1.0 mL PBS 悬浮细胞。取 10 μL 血球悬浮液，加入等量的 trypan blue (Sigma T-6164; 0.4% trypan blue in 1.4% NaCl) 后，以血球计数器(hemocytometer)计算血球总数；其余血球悬浮液置于冰上备用。

## 2.4. CpG-ODN 与虾血球细胞结合分析

为确认不同序列的 ODN 与虾血球表面受器结合饱和浓度，实验中以不同浓度 FAM-ODN 与血球作用后，利用流式细胞仪(Cytomics FC 500; BECKMAN COULTER)分析之。实验中，将来自同一尾虾子且悬浮于 0.01 M PBS 的细胞悬浮液(约  $5 \times 10^6$  cells/mL 细胞数)，分装至 5 管，每一管 200 μL；接着，每一管分别加入 100 μL 的 PBS 及四种不同浓度的 FAM-ODN，置于室温作用 1 分钟后，离心，去除上清液，以 10% 甲醛(formaldehyde)固定液处理细胞 10 分钟后，以 4°C 于 800 ×g 离心 5 分钟，去除上清液，以 PBS 悬浮细胞。接着，以流式细胞仪进行分析，观察 FAM-ODN 于细胞表面结合之变化。

## 2.5. 虾子酚氧化酶素(phenoloxidase, PO)活性的测定

本实验分别测定体外血球胞外液和虾子血球及血浆内的 PO 活性。根据 Chuo 等(2005)实验步骤进行体外血球胞外液样本 PO 的测定[15]。不同浓度的 CpG-ODN 溶液 100 μL 分别与 200 μL 虾血球悬浮液混匀后，静置 15 分钟；经 4°C，800 ×g 离心 5 分钟后，吸取 10 μL 上清液，利用 Bradford 方法测定蛋白质浓度外，另取 50 μL 胞外上清液测定酚氧化酶素(PO)活性。至于虾子血球和血浆之 PO 活性的测定前，取 100 μL 的 ODN 溶液由虾体腹节处注射后 1 小时，分别抽取虾血淋巴液。经离心后，取上清液即血浆样本，沉淀即为血球样本。血球样本经悬浮并高速离心后的上清液即为血球细胞萃取液(hemocyte lysate supernatant; HLS)。取 50 μL 待测样本、加入 50 μL 浓度 1 mg/mL 胰蛋白酶(Trypsin)后，置于室温下反应 15 分钟后，加入 200 μL 新鲜配置之受质溶液 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine, 1.6 mg/mL)，并立即在波长 490 nm 下测定吸光值(OD<sub>490</sub>)。取前五分钟内且单位时间内最大变化的 OD 数值，以变化 0.001

为 1 U, 获得 PO 活性, 以 $(\Delta U / \Delta t) / \text{mg}$  表示。根据 Chao 等实验指出, 样本加入胰蛋白酶后所测得的 PO 活性, 视为样本内原含有的 proPO 总量, 以  $\text{PO}_T$  表示[15]。

## 2.6. 基因之 mRNA 表现量的测定

本实验利用半定量反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)进行分析。首先制备血球 RNA 样本。取虾血球(约  $1 \times 10^7$  细胞)加入 1 mL 的 Trizol 试剂(Boehringer Mannheim, Roche)于室温下作用、离心后, 取上清液; 以异丙醇(isopropanol)沉淀出 RNA, 以酒精进行盐洗、风干。以核酸测定仪定量 RNA 浓度为 A260/A280 介于 1.8~2.0, 方能进行后续的 RT-PCR。本实验测定之五种防御相关基因的专一性引子序列如表 2 所示。使用 First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)进行, 实验中取 5  $\mu\text{g}$  的 RNA 样本, 加入 1  $\mu\text{L}$  的 Oligo-d(T)18 引子, 再加入适量的 DEPC 水使总体积为 11.5  $\mu\text{L}$ 。在 65°C 加热 5 分钟后使温度缓慢降至室温。接着, 依序加入 4  $\mu\text{L}$  的 5X 反应缓冲液、2  $\mu\text{L}$  的 10 mM 之 dNTP 混合液、0.5  $\mu\text{L}$  的 RNase 抑制剂(20 U/ $\mu\text{L}$ )、以及 1  $\mu\text{L}$  的反转录酶素(reverse transcriptase, 20 U/ $\mu\text{L}$ ), 使总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。于 42°C 水浴一小时后, 以 85°C 加热 5 分钟后, 置于冰上备用。

配制 1% 胶体, 于迷你电泳槽(RunOne, EmbiTec), 在电压 100 伏特下进行电泳约 30 分钟, 取出胶体用溴化乙锭(ethyl bromide)染色 10 秒, 再以清水退染 20~30 分钟, 最后置于紫外光源下照像存档。接着, 使用 ImageMaster2D 软件分析目标片段, 将目标片段之条带亮度量化。本实验以虾血球中正常表现的  $\beta$ -actin 基因作为参考基因(internal control), 以其 mRNA 表现量于胶体中的条带亮度当作分母, 目标基因之条带亮度当作分子, 所得比值即为目标基因之 mRNA 表现量。

## 2.7. 易感性分析

虾子驯养至少 1 周后, 每一尾虾子注射 2.5  $\mu\text{g}$  的 LPS 刺激虾子 1 小时后, 测定血浆中  $\text{PO}_T$  和血球 GPx 活性表现确认虾子处于发炎状况。接着, 将虾子分为四组, 每一组 20 尾虾子。一天后, 其中两组分别注射 2  $\mu\text{g}$  的 ODN2140 和 ODN3006, 并同时感染 100  $\mu\text{L}$  致病菌 *Lactococcus garviae* ( $10^8$  cells), 两个对照组分别为注射 PBS 取代 ODN 以及 PBS 取代 ODN 和致病菌。接着连续观察并记录虾子死亡尾数,

**Table 2.** The primers of selected genes for semi-quantitative RT-PCR  
**表 2.** 用于半定量反转录聚合酶链式反应之目标基因的引子

基因名称 Gene title	基因库编号 GenBank number	引子序列 Primer sequence (5'→3')	大小 Size (bp)
Prophenoloxidase ( <i>propo</i> )	AY947400	SP9 F: GATACTGCCACTTGCTCTCT SP8 R: CTTGCAGGGTTCAAGAAG	2098
Anti-LPS factor ( <i>alf</i> )	EU826055	amp F: CTACTTCAGGGCCGGATGT amp R: TTTTATTAAACAGTCTCATGTTGA	453
$\alpha 2$ -Macroglobulin ( $\alpha 2$ -M)	FL657275	$\alpha 2$ M F: CGAGGTGCGAACAGGAAG $\alpha 2$ M R: CCGGGCAGGTACTGTGAC	245
Peroxinectin ( <i>pon</i> )	AY606270	pon F: CCTTTGGCATCAGCACCCGTT pon R: CCGTGATCTCTGCCTCGGTGGA	373
Cytochromeoxidase subunit ( <i>cos</i> )	FL657276	cos F: CGCGCAGGTACCCCTAATA cos R: GCCGCTAGTGGTGGATAAAC	162
$\beta$ -actin	AY947402	$\beta$ -actin F: CCCAGAGCAAGAGAGGTA $\beta$ -actin: RGCGTATCCTTCGTAGATGGG	309

注: 所有目标基因进行 PCR 的退火温度为 58°C, 循环 24 次。

直到连续 48 小时无死亡发生为止。换算出专一性死亡率，12 小时内死亡属非专一性死亡。

$$\text{专一性死亡率}(\%) = (\text{实验组死亡只数} - \text{非专一死亡数}) / (\text{总数} - \text{非专一死亡数}) \times 100\%.$$

## 2.8. 统计分析

血球细胞之 PO 活性和免疫相关基因 mRNA 表现量的数据以 one-way ANOVA 进行各不同喂食处理组间的比较，分析后有显着差异者( $p < 0.05$ )，再以 Duncan 比较各组间的差异。

## 3. 结果

### 3.1. 不同序列 CpG-ODN 能结合血球细胞

为确定设计且人为合成之四种不同序列的 ODNs 是否能直接与血球细胞作用，本实验以不同浓度(0, 0.1、0.5、1、2、5、10、20、30、40 及 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )且标定荧光素 FAM 的 ODN 与虾血球作用后，利用流式细胞仪分析其结合血球细胞的百分率。**图 1** 结果发现，ODN 于低浓度时(0.1 至 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，ODN2050 和 2051 于 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  能结合的血球百分率均高于 5%，于 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  能结合的血球百分率均超过 10%。ODN3006 和 4006 于 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  能结合的血球百分率仅分别为 1% 和 0.6%；ODN3006 于 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  能结合的血球百分率升高至 12%，然 ODN4006 仅能结合 3% 的血球细胞。

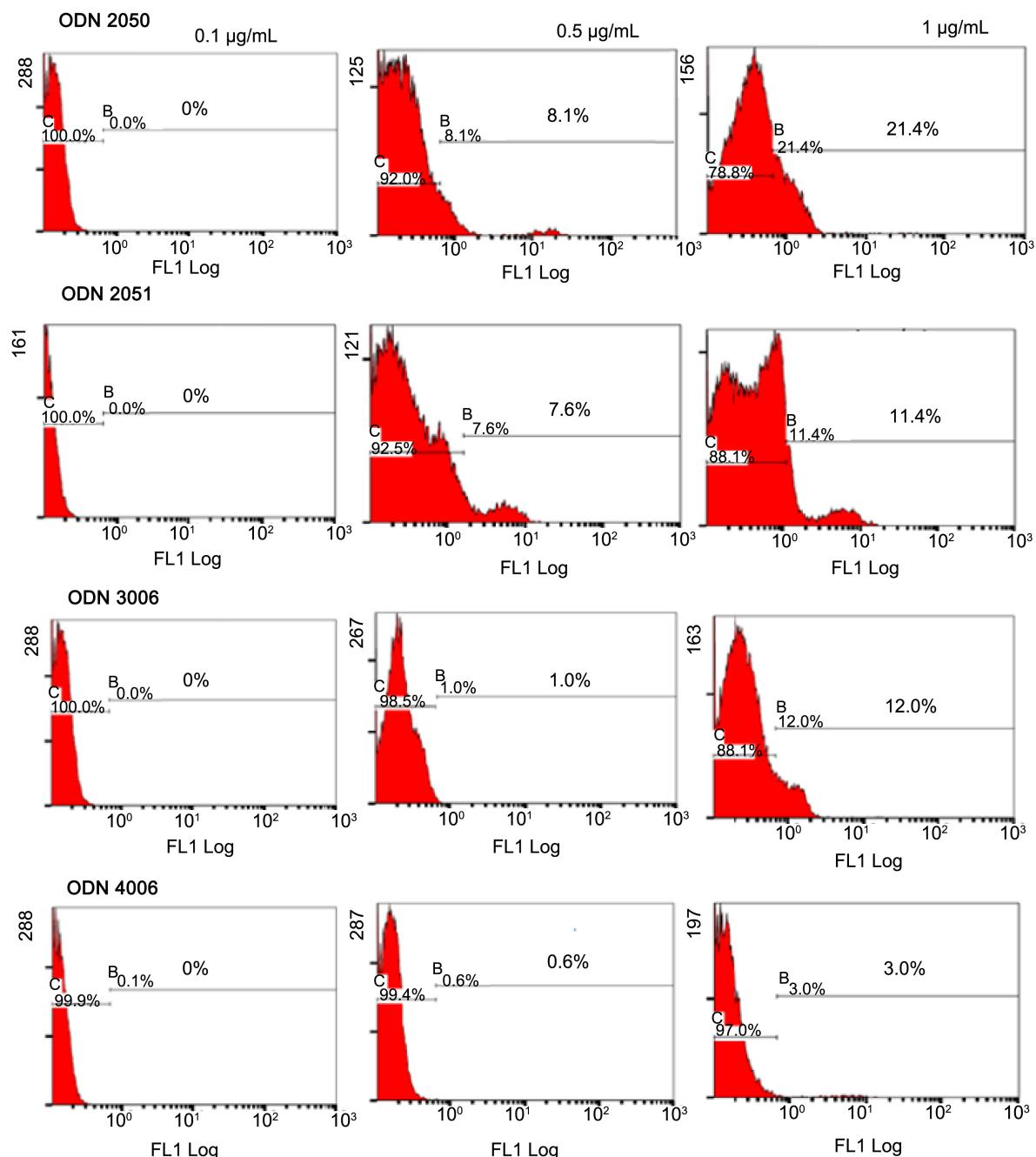
当 ODN 于浓度 1 至 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，包括对照组 ODN2006 和 ODN2014 在内的所有 ODNs 结合血球的百分率随浓度而增加(**图 2**)；四种 ODNs 中以 ODN2050 结合 50% 血球所需浓度(required concentration for binding 50% of the cells, BC<sub>50</sub>)最低(1.88  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，其他 ODNs 的 BC<sub>50</sub> 依浓度低至高分别是 ODN2006 (4.43  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < ODN2051 (4.59  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < ODN3006 (6.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < ODN2140 (6.66  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) < ODN4006 (9.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。此外，除 ODN3006 与 ODN4006 于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  仅能结合 72% 和 88% 的血球外，其他 ODNs 均能结合约 95% 血球，但所需浓度不同，其中 ODN2050 仅需 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  即能与约 95% 血球结合。本实验利用荧光单染分析 ODN3006 与 ODN2050 与血球细胞表面的结合位是否相同。实验中，使用固定浓度的 FAM-ODN3006 (12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 分别与不同浓度的 ODN2050 (0、12.5 及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 共同处理虾血球细胞后，以流式细胞仪分析 FAM-ODN3006 于细胞表面结合之变化。结果如**图 3** 所示，随 ODN2050 浓度的增加，测得能与 FAM-ODN3006 结合的细胞百分率下降。

### 3.2. 不同序列 CpG-ODN 于体外影响血球细胞酚氧化酶素(PO)的活性

实验以不同浓度(0.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$  至 13.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ODNs 直接与血球作用后，测定细胞外液中总酚氧化酶素活性(PO<sub>T</sub>)的结果显示，除 ODN2014 抑制 PO<sub>T</sub> 外，其他 ODNs 均可以增加 PO<sub>T</sub>，即促进血球细胞的释颗粒作用(**图 4**)。以高于未加入 ODN 处理之对照组活性的 1.5 倍为基准发现，正对照组的 ODN2006 于 0.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$  即可以明显增强 PO<sub>T</sub>，其次是 ODN2050 和 ODN3006 至少为 0.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$  能明显增强 PO<sub>T</sub>，ODN4006 及 ODN2051 则分别要大于 1.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  才具有明显刺激 PO<sub>T</sub> 表现。

### 3.3. 不同序列 CpG-ODN 影响虾子的免疫力

相较于无 ODN 处理的对照组，虾子注射剂量 2  $\mu\text{g}/\text{尾}$  的 ODN 后 1 小时测定的血浆 PO<sub>T</sub> 显示，ODN2050、ODN2051 及 ODN4006 三组虾子血浆 PO<sub>T</sub> 与正对照组 ODN2006 相同，均明显地增加，其中 ODN2050 为对照组的 3.8 倍；至于 ODN3006 和 ODN2140 则与对照组无明显差异(**图 5(a)**)。除 PO<sub>T</sub> 外，本实验分析四个免疫相关的基因表现以评估不同序列 ODNs 对虾子的影响，包括：原酚氧化酶素活化系统(prophenoloxidase-activating system, PAS)相关基因 *propo*、*pon* 及 *α2-m* 以及抗微生物相关基因 *alf*。相对于对照组的各基因之 mRNA 表现量，ODN 处理虾子后 3 小时测得的 mRNA 表现量如**图 5(b)** 显示，

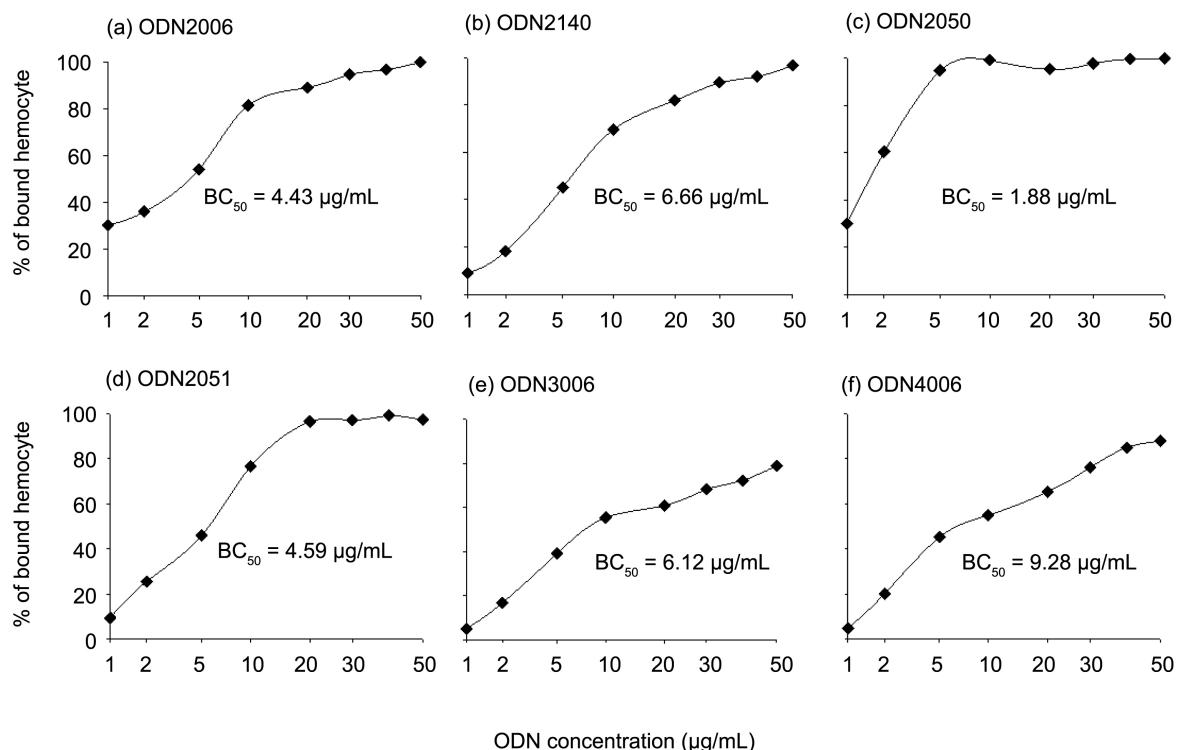


**Figure 1.** The percentage of prawn hemocyte bound by the low concentration of CpG-ODN  
**图 1.** 低浓度 CpG-ODN 结合虾血球细胞的百分率

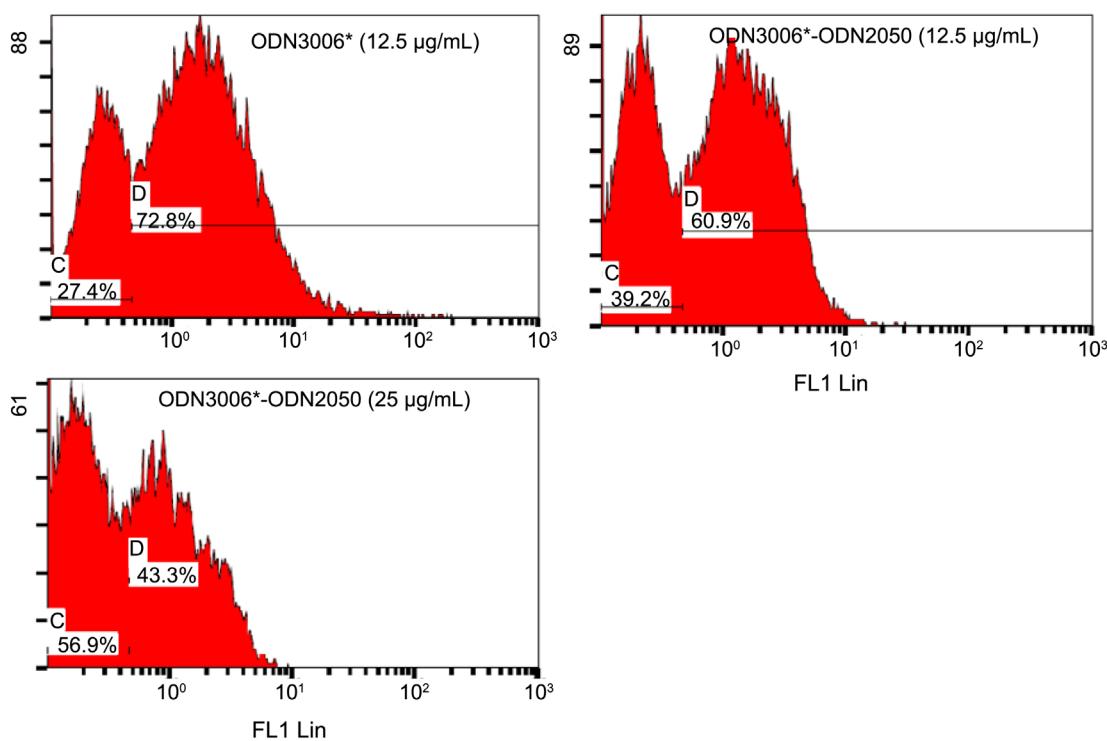
ODN2006 组虾子有四种免疫相关基因(*propo*、*pon*、 $\alpha2\text{-m}$  和 *alf*)的 mRNA 表现量明显升高；相反地，ODN2140 和 ODN3006 组分别有 3 种(*propo*、 $\alpha2\text{-m}$  和 *alf*)和 2 种(*propo* 和 *pon*)基因的 mRNA 明显低于对照组。至于 ODN4006 组虾子之四种基因的 mRNA 表现与对照组无显著差异。

### 3.4. CpG-ODN2014 和 CpGODN3006 降低发炎性虾子感染后的死亡

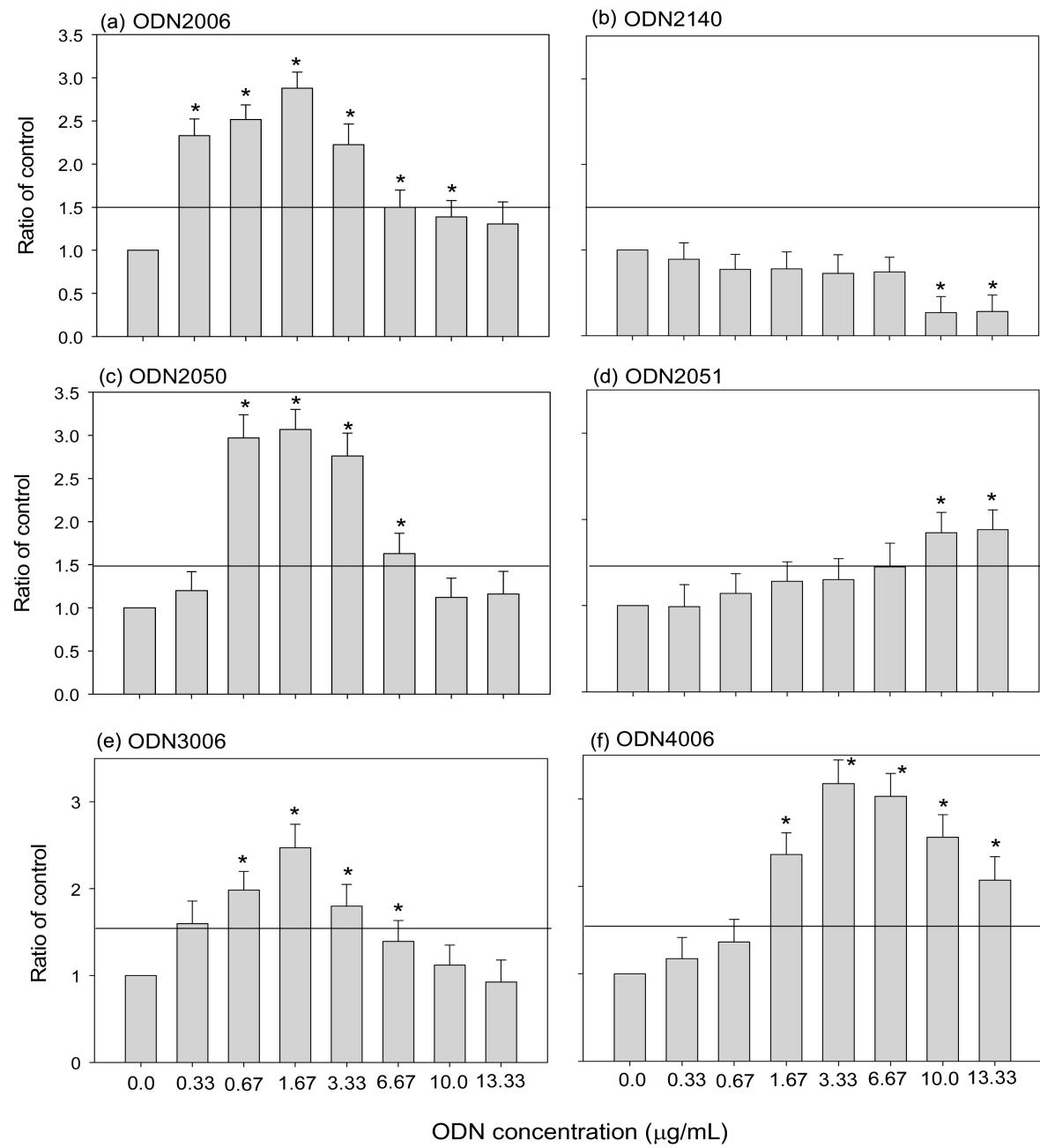
由图 5 结果推测 ODN2140 和 ODN3006 可能对虾子免疫力具有抑制性，也许可以降低发炎状态虾子



**Figure 2.** The percentage of prawn hemocyte bound by CpG-ODN at concentration higher than 1  $\mu\text{g/mL}$   
**图 2.** 浓度高于 1  $\mu\text{g/mL}$  之 CpG-ODN 结合虾血球细胞的百分率



**Figure 3.** Distribution of prawn hemocyte bound by two CpG-ODN detected by single-fluorescent staining  
**图 3.** 利用单荧光素染法测定两种 CpG-ODN 结合虾子血球细胞的分布



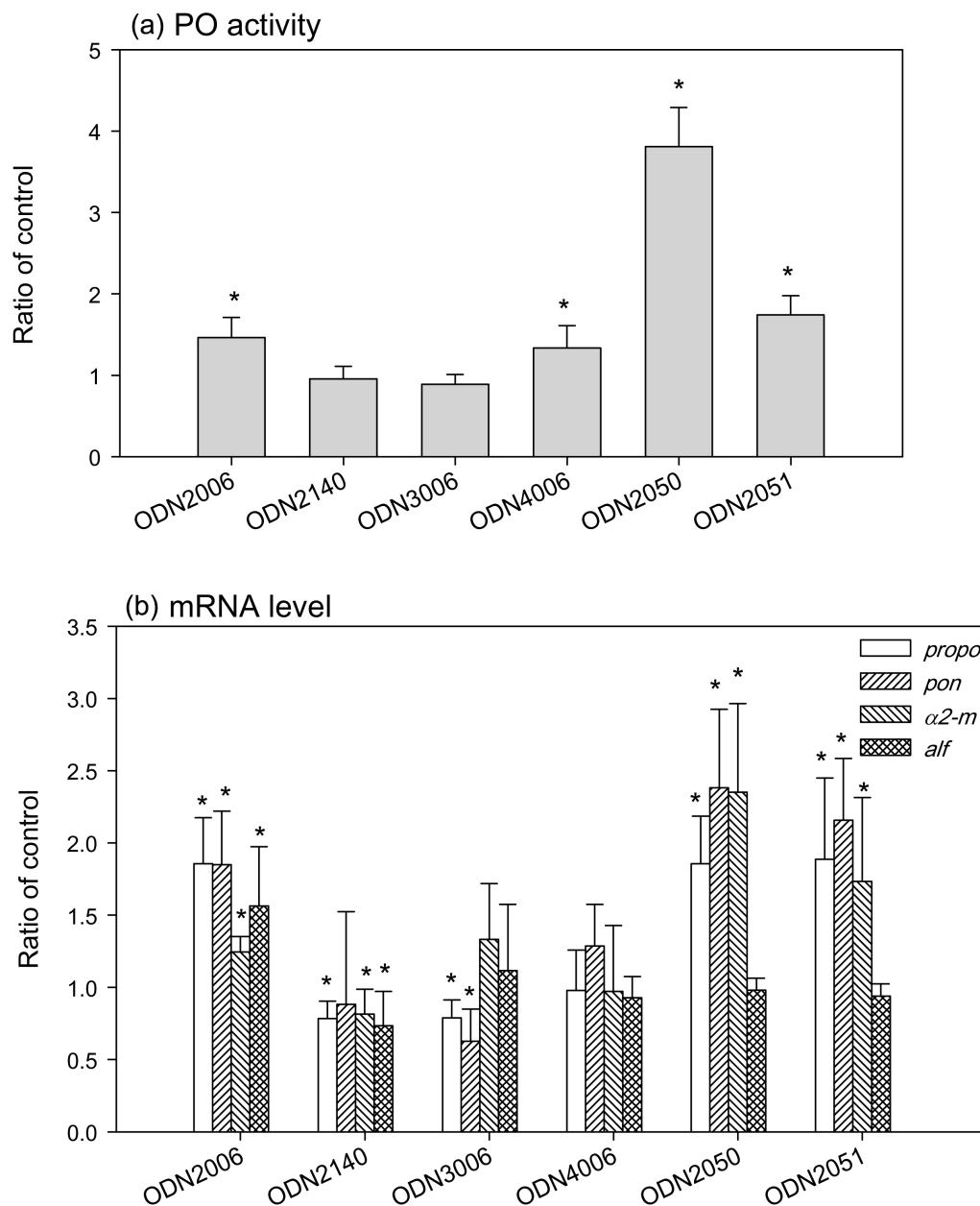
直线为实验组酵素活性为无 ODN 处理之对照组活性的 1.5 倍之标记。\*表示实验组数据经统计分析明显与对照组具有差异( $p < 0.05$ )。

**Figure 4.** Intracellular phenoloxidase activity ( $PO_T$ ) after hemocytes treated with different concentrations of CpG-ODN  
**图 4.** 不同浓度 CpG-ODN 处理虾血球后释出胞外的总酚氧化酶活性( $PO_T$ )

因感染而造成的死亡。实验以 LPS 诱发虾子发炎反应后 1 天，以致病菌 *Lactococcus garviae* ( $1 \times 10^8$  cells/尾) 感染虾子后发现，感染但未以 ODN 处理组之虾子的死亡率为 85%；当虾子感染的同时以剂量 2  $\mu\text{g}/\text{尾}$  的 ODN3006 或 ODN2140 处理后，虾子的死亡率分别会降低至 65% 和 60% (表 3)。

#### 4. 讨论

Krieg 等(1995)设计合成许多长度不同的 CpG-ODN 以进行活性研究指出，具有刺激免疫功能的最佳



(a)为处理后一小时测定血浆中 POT; (b)为处理后三小时后测得血球的基因表现。\*表示实验组数据经统计分析明显与对照组具有差异( $p < 0.05$ )。

**Figure 5.** Phenoloxidase activity and immune-related gene expression after prawn injected with different CpG-ODNs

**图 5. 不同 CpG-ODNs 注射虾子后 PO 活性及免疫相关基因的表现**

ODN 是以 CpG 为核心且由 20 个核苷酸组成[7]; 但是邻近 CpG 的区域序列不同, 在小鼠和人类的刺激效果有异[22]; 其他研究也证明, CpG 基序(CpG motif)的刺激效应具有序列特异性的(sequence specific), 且核心的 CpG 改成 GpC 会丧失活性的刺激效应[7] [23]。在哺乳类, 对于合成对免疫细胞有效 CpG-ODN 的相关研究已多有了解, 但是在其他物种或脊椎动物了解则非常有限。在鱼类养殖, 已知 CpG 寡脱氧核糖核酸(简称 CpG-ODN)具有刺激免疫活性, 可做为疫苗的佐剂; 但是序列不同对相同免疫反应的效果不

**Table 3.** Mortality of LPS-stimulated prawn treated with inhibitory CpG-ODN after infection  
**表 3.** 脂多醣刺激之虾予以抑制性 CpG-ODN 处理后感染的死亡率

处理方式 Treatment	攻击处理 Challenge	感染后不同时间之虾子的死亡数目 Number of death after challenge								死亡百分率 Mortality (%)
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	
ODN2140 (N = 20)	+	4	4	1	1	1	1	0	0	60
ODN3006 (N = 20)	+	5	3	2	1	2	0	0	0	65
PBS (N = 20)	+	7	4	3	3	1	0	0	0	85
PBS (N = 10)	-	1	0	0	1	0	0	1	0	10
None (N = 10)	-	0	0	0	0	1	0	0	0	0

注: d 表示感染后天数。N 表示实验用的数目。连续 2 天没有死亡发生后再出现的死亡被认定为非专一性死亡(详见材料方法)。

同外, 核心基序反向则会使刺激性消失[23] [24]。

本研究室曾利用不同序列 CpG-ODN 刺激虾子的血球细胞后发现, ODN2006 激发虾血球基因 *proPO* 的表现会被 os-ODN13 抑制[16], 推测不同序列的 ODN 可能对虾免疫力具有不同效应。Sun 等(2013)曾将 5 种分别对哺乳类和水生动物有效的 CpG-ODNs 连结成一段富含 CpG 且 110 个核苷酸组成的 ODN, 发现可以诱发白虾的细胞性免疫力[25]。Su 等(2016)曾根据已发表的 6 段 ODNs 以及 3 段能刺激草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 头肾单核细胞增生的 ODNs, 组合成一段新的 ODN1670A, 证明此 ODN 能激发 TLR9 表现以及在病毒感染时促进第二型干扰素(IFN $\gamma$ )表现[26]。因此, 我们认为利用不同策略发展不同影响效应的 CpG-ODN 以应用在养殖虾, 以调节不同状况时虾子的免疫力, 应该是非常重要且可行的。

本研究室曾收集已发表且分别与鱼类和人类有关的 CpG 寡聚脱氧核苷酸各 30 段和 11 段, 其中 32 段为刺激序列和 9 段为抑制序列。以 oligomer 计数程序进行序列分析后, 分别根据在刺激序列和抑制序列中出现次数较多的 5-mer 和 6-mer 核心基序, 以头尾相接方式随机排列获得数段疑为刺激性和抑制性之不同序列 ODN (未公开)。本研究随机选择一段四段疑为抑制性或刺激性的 ODN2050、ODN2051、ODN3006 及 ODN4006 进行免疫调节作用的分析。由于本研究试图找到对虾子免疫力具有不同影响的 CpG-ODN, 实验虾在进行分析前会以 M199 缓冲液于体外处理血球细胞, 分别测定胞内和胞外 PO<sub>T</sub>, 当胞外 PO<sub>T</sub> 低于胞内 PO<sub>T</sub> 的虾子, 则被认定为未发炎的虾子。

#### 4.1. CpG-ODN 于体外对血球细胞的作用

Sung 等(2010)实验指出, CpG-ODN 直接结合血球细胞以刺激活性[17]。因此, 本研究首先确定四种 CpG-ODNs 是否结合血球细胞, 接着再利用体外实验, 初步决定四种 CpG-ODNs 对血球细胞的直接影响效应。相较于 ODN2006 和 ODN2140 分别于 30 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时可以结合近 95% 和 92% 的血球细胞, 本研究的四种 ODNs 中, ODN2050 和 ODN2051 也可以与超过 95% 的细胞结合, 但所需浓度较低; 然而 ODN3006 和 ODN4006 于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 只能与 72% 和 88% 的细胞结合。这些结果推测, ODN2050 和 ODN2051 可以作用大部分的血球细胞, ODN3006 和 ODN4006 则与特定的血球族群结合, 尤其是 ODN3006。此外, 由图 1 的低浓度 ODN 与血球结合率和结合 50% 血球细胞所需浓度( $\text{BC}_{50}$ )结果发现, ODN2050 于 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  能与 8.1% 细胞结合, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  能结合 21% 血球, 均高于其他的 ODNs, 且  $\text{BC}_{50}$  也远低于其他 ODNs。由本研究的图 3 结果, ODN2050 和 ODN3006 能与相同细胞族群的相同分子结合, 随 ODN2050 浓度增加, 能与 ODN3006 结合者下降。这些结果推测的可能原因包括: ODN2050 结合血球细胞的亲和力高于其他 ODN 或是血球细胞上能与 ODN2050 结合的分子种类不只一种。这些推测仍须进一步利用竞争实验和其他方法作验证。

不论细胞结合率是否有差异，在没有其他因子的影响下，正对照的 ODN2006 和四种 ODNs 都能增加虾子血球胞外的 PO<sub>T</sub>，即刺激释颗粒作用；但是效刺激浓度有差异(图 3)。负对照的 ODN2014 则会抑制释颗粒作用。研究曾指出，核心的 CpG 改成 GpC 后会失去对小鼠和鱼类的刺激效应[7] [23]。有趣地，ODN2050 则是根据此原则而设计，将具有 CG 且为抑制性的 ODN2014 序列中再增加 CG 而获得，预测可能具抑制作用，但本次的体外测定结果却与预期相反。推测其可能原因有三：需要虾体内其他因子的偕同作用才会具有抑制作用、CG 重复次数与 ODN 效果有关、以及物种差异所致。

#### 4.2. CpG-ODN 于虾体内对血球免疫反应的影响

由于虾体内影响因子复杂，为了解体外实验所测得 ODNs 的作用是否在进入虾体后仍是一致的，本研究进一步将不同序列的 CpG-ODNs 注射入虾体腔后，分析血球的释颗粒作用(POT 表现)以及血球内三个原酚氧化酶素活化系统(PAS)相关的基因(*propo*、*pon* 和  $\alpha 2\text{-m}$ )和一个抗微生物基因 *alf* 的表现(mRNA 表现量)。结果显示，正对照之促进性 ODN2006 能增强血球释颗粒作用和促进四种免疫基因的转录；ODN2050 和 ODN2051 对三种 PAS 相关基因的转录均都具促进作用，且增强血浆 PO<sub>T</sub> 的结果与体外实验结果一致，其中 ODN2050 效果优于 ODN2051。Xu 等(2016)研究指出，亲和力强的 ODN 刺激虾子免疫力的效果强于亲和力弱者[27]。根据图 1 和图 2 血球结合率的结果，我们推测 ODN2050 的亲和力可能高于 ODN2051。

意外地，ODN3006 于体外能刺激释颗粒作用，但在虾体内不但对血浆 PO<sub>T</sub> 和基因  $\alpha 2\text{-m}$  无影响，且抑制基因 *propo* 和 *pon* 的转录，对血球的影响效应与抑制性的 ODN2140 雷同(图 5)。针对淡水长脚大虾，过往的研究已经证明 ODN2006 进入虾体后可以经由不同讯号路径来激活虾血球的 PAS 活性和促进基因 *propo* 的转录；而 os-ODN13 不影响 *propo* 表现但会抑制 ODN2006 的促进效应[15] [16] [17]。由上述结果推测，ODN2050、ODN2051 和 ODN3006 可能透过不同路径以影响虾子的 PAS，前两种 ODNs 如 ODN2006 应该属促进性；而 ODN3006 则可能是抑制性。至于 ODN4006 可能与 os-ODN13 相似，可能具有中和其他 ODN 的影响效应，属中和型。

前人实验指出，不同物种能辨识的 ODN 可能有差异[8]，邻近 CpG 的区域序列不同，在不同物种之间的刺激效果也不同[22]，显示 CpG 基序的刺激效应具有序列特异性的[7] [23]。本研究的四种 CpG-ODNs 是根据已知对鱼类和人类有影响的 ODN 设计而获得。体外及体内实验发现，ODN2050 的影响效应均与设计所预测的相反。之前曾推测 ODN2050 可能需要虾体内其他因子的偕同作用才会具有抑制作用。但是体内实验证明此推测不成立。另外，ODN3006 核心中不具 CG 且 GC 重复数多于 ODN2006，但由于虾体内的影响效也与预测相反。根据本研究的免疫反应与细胞结合率等结果推测本实验的四种 CpG-ODNs 效应之差异，除了可能因物种不同造成 ODN2050 和 ODN3006 的影响与预测有差异外，ODN 核心中 GC 和 CG 出现频率以及 ODN 对血球的结合率和亲和力都可能与 ODN 的影响效应有关。这些必须更多实验已证明之。

#### 4.3. 抑制性 CpG-ODN 降低发炎性虾子感染后的死亡

脂多醣分子(LPS)为病原相关的分子模式(PAMP)之一，可以增强动物的发炎反应，包括虾类[28]。为确认实验虾处在发炎状态，我们在预备实验中，以虾子血浆中的 PO<sub>T</sub> 和血球内谷胱甘肽过氧化酶活性 (Glutathione Peroxidase, GPx)作为发炎指标，测得每一尾虾子注射 2.5 μg 的脂多醣分子(LPS)后 1 小时，虾子之 PO<sub>T</sub> ( $45.7 \pm 9.92$  U/min/mg)高于未注射 LPS 的对照组组( $64.4 \pm 8.10$  U/min/mg)，GPx 活性( $6.1 \pm 1.7$  U/mg)也高于对照组( $2.6 \pm 1.5$  U/mg)。因此，本研究将 2.5 μg/尾 LPS 剂量注射处理后之虾子定义为发炎性虾子。本研究假设感染后虾子能因给予抑制性 ODN 减缓发炎作用而降低因感染造成的死亡率。以易感性

实验发现，疑似抑制性 ODN3006 或 ODN2140 处理之发炎性虾子在感染后的死亡率确实低于未处理组死亡率(表 3)，显示虽然无法大幅度降低发炎状态虾子的易感性，但此两种抑制性 ODNs 仍然具有降低虾子死亡的功用，证明 ODN3006 和 ODN2140 应为抑制性。至于 ODN3006 的抑制性是否与亲和力(图 1)较低和仅结合特定血球族群(图 2)有关，须进一步厘清。

## 5. 结论

综合本研究实验结果，四段不同序列的 CpG-ODNs 对虾子免疫反应具有不同的调节作用。ODN2050 和 ODN2051 都能增强虾子血球的释颗粒作用和 PAS；反之，ODN3006 抑制这些血球的免疫反应；ODN4006 则对免疫反应无明显影响。此外，抑制性 ODN3006 能降低发炎状态之虾子的易感性。本研究结果可以提供开发不同效应之 CpG-ODNs 以应用于养殖业之参考。未来或许可以视养殖虾子的状态，选择最适效应的 ODN 以提升养殖期间虾子的存活。以受到感染且发炎的虾子为例，持续给予促进性 ODN2050，也许会导致过度发炎反应而加速虾子的死亡；若给予抑制性 ODN3006 可能降低发炎而减缓虾子的伤害。

## 致 谢

本研究感谢科技部补助研究经费(NSC 98-2313-B-031-001-MY3)得以顺利完成。

## 参 考 文 献 (References)

- [1] Anderson, D.P. (1992) Immunostimulant, Adjuvants and Vaccine Carriers in Fish: Application to Aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 281-307. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90067-8](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90067-8)
- [2] Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A. and Zenteno, E. (2009) Review: Immunity Mechanisms in Crustaceans. *Innate Immunity*, **15**, 179-88. <https://doi.org/10.1177/1753425909102876>
- [3] Janeway, C.A. (1992) The Immune System Evolved to Discriminate Infections Nonself from Noninfectious Self. *Immunology Today*, **13**, 11-16. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90198-G](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90198-G)
- [4] Krieg, A.M. and Wagner, H. (2000) Causing a Commotion in the Blood: Immunotherapy Progresses from Bacteria to Bacteria DNA. *Immunology Today*, **21**, 521-526. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01719-9](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01719-9)
- [5] Häcker, H., Redecke, V. and Häcker, H. (2002) Activation of the immune system by Bacterial CpG-DNA. *Immunology*, **105**, 245-251. <https://doi.org/10.1046/j.0019-2805.2001.01350.x>
- [6] Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O. and Tokunaga, T. (1992) Unique Palindromic Sequences in Synthetic Oligonucleotides Are Required to Induce IFN and Augment IFN-Mediated Natural Killer Activity. *Journal of Immunology*, **148**, 4072-4076.
- [7] Krieg, A.M., Yi, A., Matsin, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. and Klinman D.M. (1995) CpG Motifs in Bacterial DNA Trigger Direct B-Cell Activation. *Nature*, **374**, 546-549. <https://doi.org/10.1038/374546a0>
- [8] Takeshita, F., Leifer, C.A., Gursel, I., Ishii, K.J., Takeshita, S., Gursel, M. and Klinman, D.M. (2001) Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 9 in CpG DNA-Induced Activation of Human Cells. *The Journal of Immunology*, **167**, 3555-3558. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.7.3555>
- [9] Carrington, A.C., Collet, B., Holland, J.W. and Secombes, C.J. (2004) CpG Oligodeoxynucleotides Stimulate Immune Cell Proliferation But Not Specific Antibody Production in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **101**, 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.022>
- [10] Jørgensen, J.B., Johansen, L.H., Steiro, K. and Johansen, A. (2003) CpG DNA Induces Protective Antiviral Immune Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology*, **77**, 11471-11479. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11471-11479.2003>
- [11] Meng, Z., Shao, J. and Xiang, L. (2003) CpG Oligodeoxynucleotides Activate Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, **27**, 313-321. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00104-0](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00104-0)
- [12] Tassakka, A.C.M.A.R. and Sakai, M. (2003) The *In Vivo* Effect of CpG Oligodeoxynucleotides on the Innate Immune Response of Common Carp. *Cyprinus Carpio* L. *Aquaculture*, **220**, 27-36.

[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00275-2)

- [13] Tassakka, A.C.M.A.R. and Sakai, M. (2004) Expression of Immune Related Genes in the Common Carp (*Cyprinus Carpio* L) After Stimulation by CpG Oligodeoxynucleotides. *Aquaculture*, **242**, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.041>
- [14] Kanellos, T., Sylvester, I.D., Howard, C.R. and Russell, P.H. (1999) DNA Is as Effective as Protein to Inducing Antibody in Fish. *Vaccine*, **17**, 965-972. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00312-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00312-0)
- [15] Chuo, C.P., Liang, S.M. and Sung, H.H. (2005) Signal Transduction of Prophenoloxidase Activating System of Prawn Haemocytes Triggered by CpG Oligodeoxynucleotides. *Fish & Shellfish Immunology*, **18**, 149-162. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.06.009>
- [16] Sung, H.H., Chu, C.W., Lin, Y.H. and Chang, P.T. (2009) The Effect of Two CpG Oligodeoxynucleotides with Different Sequences on Haemocytic Immune Responses of Giant Fresh Water Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Fish & Shellfish Immunology*, **26**, 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.11.017>
- [17] Sung, H.H., Chen, P.H., Chuo, C.P., Cheng, Y.L. and Chang, P.T. (2010) Endocytosis and NF- $\kappa$ B Involved in the Signal Pathway of the Degranulation and Expression of Prophenoloxidase Messenger RNA of Prawn Hemocytes Triggered by CpG Oligodeoxynucleotide. *Zoological Studies*, **49**, 19-27.
- [18] Chen, Y., Xiang, L. and Shao, J. (2007) Construction of a Recombinant Plasmid Containing Multi-Copy CpG Motifs and Its Effects on the Innate Immune Responses of Aquatic Animals. *Fish & Shellfish Immunology*, **23**, 589-600. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.01.006>
- [19] Zhang, Y., Song, L., Zhao, J., Wang, L., Kong, P., Liu, L., Wang, M. and Qiu, L. (2009) Protective Immunity Induced by CpG ODNs against White Spot Syndrome Virus (WSSV) via Intermediation of Virus Replication Indirectly in *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, **34**, 418-424. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.11.012>
- [20] Carrington, A.C. and Secombe, C.J. (2006) A Review of CpGs and Their Relevance to Aquaculture. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **112**, 87-101. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.015>
- [21] Chiu, S.T., Hsieh, S.L., Yeh, S.P., Jian, S.J., Cheng, W. and Liu, C.H. (2010) The Increase of Immunity and Disease Resistance of the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* by Feeding with Selenium Enriched-Diet. *Fish & Shellfish Immunology*, **29**, 623-629. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.012>
- [22] Van Uden, J. and Raz, E. (2000) Introduction to Immunostimulatory DNA Sequences. *Springer Seminar in Immunopathology*, **22**, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s002810050010>
- [23] Jørgensen, J.B., Zou, J., Johansen, A. and Secombes, C.J. (2001) Immunostimulatory CpG Oligodeoxyadenineucleotides Stimulate Expression of IL-1beta and Interferon-Like Cytokines in Rainbow Trout Macrophages via a Chloroquine-Sensitive Mechanism. *Fish and Shellfish Immunology*, **11**, 673-682. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0344>
- [24] Kanellos, T.S., Sylvester, I.D., Butler, V.L., Ambali, A.G., Partidos, C.D., Hamblin, A.S. and Russel, P.H. (1999) Mammalian Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Some CpG Motifs Have an Effect on the Immunogenicity of DNA and Subunit Vaccines in Fish. *Immunology*, **96**, 507-510. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00771.x>
- [25] Sun, R., Qiu, L., Yue, F., Wang, L., Liu, R., Zhou, Z., Zhang, H. and Song, L. (2013) Hemocytic Immune Responses Triggered by CpG ODNs in Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, **34**, 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.016>
- [26] Su, H., Yuan, G. and Su, J. (2016) A Specific CpG Oligodeoxynucleotide Induces Protective Antiviral Responses against Grass Carp Reovirus in Grass Carp *Ctenopharyngodon idella*. *Developmental & Comparative Immunology*, **60**, 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.007>
- [27] Xu, J., Zhao, D., Sun, M., Wang, L., Jia, Z., Liu, R., Wang, L. and Song, L. (2016) A-Type CpG ODN with Higher Binding Affinity to LvToll1 Could Probably Activate Downstream IFN System-Like Antiviral Response in Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Invertebrate Survival Journal*, **13**, 397-410.
- [28] Xian, J.A., Zhang, X.X., Guo, H., Wang, D.M. and Wang, A.L. (2016) Cellular Responses of the Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Haemocytes after Lipopolysaccharide Injection. *Fish & Shellfish Immunology*, **54**, 385-390. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.130>