

文章编号:1000-0615(2012)04-0503-06

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27717

利用 cDNA-AFLP 技术研究副溶血弧菌感染下 拟穴青蟹的基因差异表达

李升康¹, 朱 烁^{1,2}, 张 昭^{1,2}, 温小波¹, 李远友^{1*}

(1. 汕头大学广东省海洋生物技术重点实验室, 广东 汕头 515063; 2. 汕头大学生物系, 广东 汕头 515063)

摘要: 研究以实验室分离自汕头牛田洋青蟹养殖区的副溶血弧菌感染的健康拟穴青蟹, 利用 cDNA-AFLP 技术分析感染前后拟穴青蟹肝脏组织基因的转录表达差异, 最终获得了 23 个差异片段, 其中 20 个片段成功测序。BLAST 分析表明, 序列与已知功能基因具有同源性的有 6 个, 其中 5 个经 real-time PCR 重新验证为上调表达, 主要涉及参与能量代谢的精氨酸激酶(arginine kinase)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase), 以及参与转运过程的精氨酰 tRNA 合成酶(arginyl-tRNA synthetase), 同时, 还有直接参与免疫防御反应的凝乳状蛋白酶(chymotrypsin-like proteinase)。另外, 8 个差异片段与已知基因或序列无同源性。

关键词: 拟穴青蟹; 副溶血弧菌; 基因差异表达; cDNA-AFLP

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)属肉食性广盐、广温的经济甲壳动物, 是我国南方重要的海水养殖品种。近几年, 蟹病特别是细菌病害频发导致了重大的经济损失, 有关病害的防治及病害本身的致病机理研究显得刻不容缓。目前青蟹病害的研究取得了较多的研究成果, 但大部分集中在病原菌的分离鉴定, 青蟹应对病原刺激的病理及生化指标研究方面, 有关具体病害致病的机理研究较少, 针对具体病例的防治(包括特定免疫增强剂和微生态制剂等)的研究也仅处于起步阶段。

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)属于弧菌科, 是一种嗜盐性革兰氏阳性菌, 是汕头牛田洋拟穴青蟹养殖区的主要致病菌之一^[1-2], 具有病程短, 病死率高等特点。

青蟹感染该菌后主要表现为体弱, 昏睡, 食欲显著下降, 摄食减少或不摄食, 步足颤抖和麻痹; 甲壳变色, 附肢关节呈粉红色, 鳃水肿、不透明,

甚至发黑, 鳃上皮加厚; 血细胞减少, 并可在血中观察到该菌。

cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP)技术是 Bachem 等^[3]提出的一种基因差异表达的鉴定技术, 它结合了 AFLP 技术和 RT-PCR(reverse transcription PCR)的优点, 灵敏性高、重复性好, 不需要了解模板序列信息, 能集中显示基因组表达序列的多态性差异, 从而可以对生物体的转录本进行全面而系统地分析, 广泛地用于遗传连锁作图^[4]、基因克隆^[5]、基因差异表达分析^[6]等多个领域。由于目前拟穴青蟹的基因组信息有限, 本研究采用 cDNA-AFLP 技术, 对拟穴青蟹在实验室条件下受到副溶血弧菌感染后的基因表达情况进行了分析, 以期在分子水平上了解拟穴青蟹应对细菌病原感染的分子免疫机制, 为青蟹病原的病害防治提供依据。

收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2011-12-28

资助项目: 国家自然科学基金项目(31172424); 广东高校产学研结合示范基地科技成果转化重大项目(cgzhzd0812); 广东省海洋渔业科技推广专项项目(A200905J01); 广东省教育部产学研合作专项资金项目(2007B090400049)

通讯作者: 李远友, E-mail: yyli@stu.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的拟穴青蟹均来自汕头市牛田洋养殖区,共18只,实验室条件下暂养7d。对实验组和对照组拟穴青蟹分别注射等量的副溶血弧菌菌液和生理盐水。每组3只青蟹,实验组和对照组各3组。青蟹注射副溶血弧菌菌液12h后解剖取其肝脏组织迅速放入液氮中速冻,于-80℃下保存备用。

1.2 所用接头与引物

引物和接头均由深圳华大基因中心合成,接头序列:*EcoR*I接头:5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3';*Mse*I接头:5'-GACGATGAGTC-CTGAG-3'。

*EcoR*I 预扩增引物:5'-GACTGCGTACCA-ATTC-3';*Mse*I 预扩增引物:5'-GATGAGTCCTG-AGTAA。选择性扩增引物:*EcoR*I 选择性扩增引物:5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3';5'-GACTGCGTACCAATTCAG-3';5'-GATGAGTCCTGAGT-AACG-3';5'-GATGAGTCCTGAGTAATG-3'。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 二链合成

总 RNA 提取参照 TRIZOL (Invitrogen 公司)试剂使用说明书进行,采用 DNase I (TaKaRa 公司)去除总 RNA 中的痕量基因组 DNA。3组提取的总 RNA 等量混合。参照 PolyA Tract® mRNA Isolation Systems Z5310 (Promega 公司)试剂盒说明书从总 RNA 中分离 mRNA。

cDNA 第一链合成采用 M-MLV RTase cDNA 合成试剂盒(TAKARA 公司)进行,第二链的合成采用 TAKARA 公司生产的大肠杆菌(*E. coli*)聚合酶 I、大肠杆菌(*E. coli*)连接酶、RNase H、T₄ DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶,具体操作依照使用说明书进行。采用苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)纯化 cDNA 第二链后溶于 ddH₂O 中,存于-20℃备用。合成的 cDNA 双链分子采用 β-actin 检测其质量。

1.4 cDNA-AFLP 差异表达分析

将合成的 cDNA 双链经 *EcoR*I、*Mse*I (NEB 公司)酶切后连接接头,取5 μL 产物进行预扩增。样品的预扩增产物稀释20倍后作为模板,采用10对选择性扩增引物组合进行了 cDNA-AFLP 差异表达分析,采用普通银染方法显色。差异条带根据实验青蟹与健康青蟹的比较,分为“有→无”、“无→有”2

种类型。挖取变性胶上“有→无”,“无→有”类型的所有条带。

1.5 差异片段的回收、二次扩增及克隆测序

从6%变性聚丙烯酰胺凝胶(W/V)中切取差异条带后,采用煮沸法(95℃加热20 min)回收,并作为模板用与 cDNA-AFLP 相同的引物组合进行 PCR 扩增。产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,采用上海生工生物工程公司生产的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化。纯化后的差异片段经连接、转化及克隆,PCR 检测为阳性的克隆送深圳华大基因公司测序。

1.6 测序所得序列分析

将测序得到的 EST 序列去除载体和引物序列后,采用 NCBI (www.ncbi.nih.gov) 网站的 BLAST 序列比对工具进行同源性分析。

1.7 Real time PCR 对差异片段的重新验证

实时定量 PCR 参考文献[7]的方法。利用 SYBR Green I 检测各片段在青蟹遭受副溶血弧菌感染时的表达情况,并将 β-actin 作为内参。每样本总反应体积为20 μL。反应条件:95℃ 10 min 变性后,共进行40个循环扩增,每循环包括95℃ 15 s、60℃ 30 s 和80℃ 5 s,并在80℃读板1次。随后,以0.17℃/s 变化速度,从65~95℃每隔2 s 记录1次荧光值,获得融解曲线。反应分别设空白组、阴性对照组、阳性对照组及样品组。将扩增的 PCR 产物融解曲线分析,同时进行2%琼脂糖凝胶电泳,以确定产物是否为所扩增的目的片段。相对定量分析按 Livak 等^[8]的方法,以 β-actin 为内参照,利用 C_t 值即每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数,计算各片段在青蟹遭受副溶血弧菌感染时和正常状态下 mRNA 的相对表达量。相对定量公式: $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 其中 $-\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{处理组}) - \Delta C_t(\text{对照组})$ 。

1.8 统计分析

所有数据以3个重复组数据的平均值±标准差 (means±SD) 表示,并采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 氏检验法统计分析。对照组和实验组的差异分不显著 ($P>0.05$), 显著 ($P<0.05$) 和极显著 ($P<0.01$) 3个水平。

1.9 序列号

研究中发现的4个新序列已经存于 EMBL 数据库,其序列号分别是 V5, HE578177; V6, HE578178; V7, HE578179; V15, HE578180。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取

总 RNA 提取过程中, 用 50~100 μL DEPC 水溶解, 再用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳结果显示, 28S 条带、18S 条带清晰, 且条带边缘清晰锐利, 点样孔明亮清晰, 说明总 RNA 完整性较好, 纯度较高。分光光度计检测样品 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的值均在 1.8~2.0, 浓度 300~500 ng/L, 说明提取的总 RNA 质量较好, 可用于后续试验。

2.2 预扩增结果

cDNA 双链合成后, 采用 *EcoR* I / *Mse* I 限制性内切酶组合进行酶切, *EcoR* I 是识别序列为 6 个碱基的稀有切点酶, *Mse* I 是识别序列为 4 个碱基的常见切点酶。利用这种双组合酶对双链 cDNA 进行酶切, 可以保证预扩增产物丰富。对酶切产物加上接头, 利用与接头且互补的引物进行预扩增, 扩增结果如图 1。Vuylsteke 等^[9]在其 cDNA-AFLP 分析方案中指出酶切形成的片段分布在 100~500 bp 为最佳。本实验中, 可以看到图中 1, 2 号预扩增片段基本均在 100~500 bp 中, 弥散带分散均匀且连续成一片, 证明预扩增效果较好, 产物丰富。

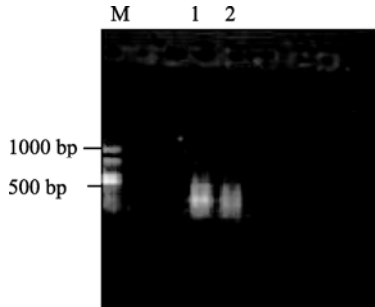


图 1 预扩增电泳检测

1: 实验组预扩增电泳检测图; 2: 对照组预扩增电泳检测图; M: DL1000 DNA Marker。

Fig. 1 Electrophoresis of pre-amplification results

1: the preamplification of experimental crab; 2: pre-amplification of controlled crab; M: DL1000 DNA Marker.

2.3 选择性扩增结果

实验设计了 4 个引物, 两两组合即有 10 对引物组合。对两组预扩增之后得到的样品分别用 10 对引物组合进行选择性地扩增, 利用非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测(图 2), 共筛选出 23 条差异条带。

2.4 序列分析

通过测序, 最终获得了 20 条差异条带的序列

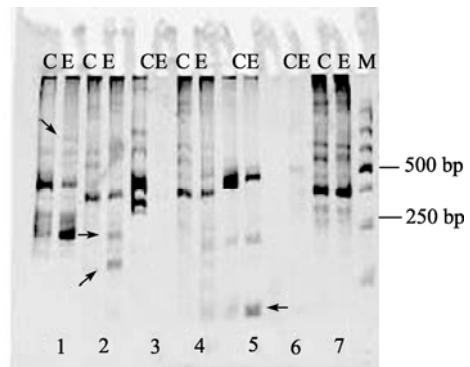


图 2 部分引物组合的 cDNA-AFLP 分析结果

C: 对照青蟹; E: 实验染菌青蟹; M: DL1000 DNA Marker; \blacktriangleright : 表示多态性片段。

1: F13-F13; 2: E2-E3; 3: E2-F7; 4: E2-F13; 5: E3-F7; 6: E3-F13; 7: F7-F13.

Fig. 2 cDNA-AFLP analysis on partial primer combinations

C: controlled crabs; E: experimental crabs; M: DL1000 DNA Marker; \blacktriangleright : Polymorphic bands

信息。通过在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), 得到了有关差异片段序列功能方面的信息。

2.5 Real-time PCR 验证差异片段

利用 real-time PCR, 采用相对定量分析方法, 进一步验证片段的差异表达情况(图 3)。经过检测, V6, V7, V11, V13, V15 等 5 个片段与对照相比, 差异极显著 ($P < 0.01$), 为真正差异表达的基因。差异表达基因的同源性分析如表 1。

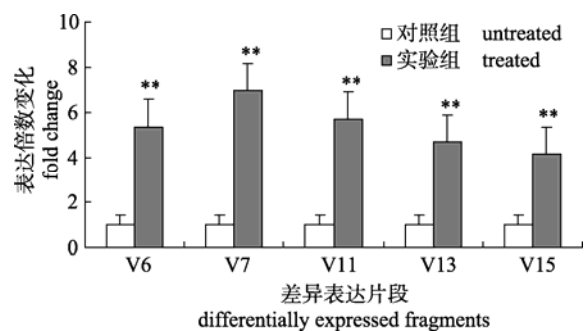


图 3 实时荧光定量验证差异片段检测结果的柱形图 V6, V7, V11, V13, V15 为差异表达片段; 实验组与对照组相比, 差异极显著 (**: $P < 0.01$)。

Fig. 3 Real-time PCR conformation of the candidates for differentially expressed fragments

V6, V7, V11, V13, V15: the candidates for differentially expressed fragments; the significant difference of treated groups and control groups was indicated with asterisks (**: $P < 0.01$).

3 讨论

拟穴青蟹肉质鲜美, 营养丰富, 广盐性, 是我

表 1 *V. parahaemolyticus* 胁迫条件下差异表达基因的同源(Blastx 结果)分析Tab. 1 Homology (Blastx) analysis of the differentially expressed genes upon *V. parahaemolyticus* infection

编号 locus	长度/bp length	同源性 closest relative	登录号 accession no.	E-值 E-value	相似度/% similarity	表达情况 expression
V6	337	phosphoenolpyruvate-carboxykinase (<i>Chasmagnathus granulata</i>)	AY074922	6e-37	204/263 (78%)	+
V7	438	arginyl-tRNA synthetase (<i>Equus caballus</i>)	XM_001503271	2e-19	109/143 (76%)	+
V11	271	arginine kinase (<i>Scylla serrata</i>)	GQ851626	1e-125	253/253 (100%)	+
V13	181	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>Scylla paramamosain</i>)	FJ774697	1e-86	181/181 (100%)	+
V15	328	chymotrypsin-like proteinase (<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	EU433385	1e-64	234/296 (79%)	+

注: -表示 VP 胁迫中下调; +表示 VP 胁迫中上调。

Notes: -means down-regulation; +means up-regulation

国东南沿海地区主要海产经济蟹类之一。随着养殖规模的扩大和集约化程度的增高及养殖环境的恶化,青蟹病害时有发生。副溶血弧菌广泛分布于近海岸的海底及海产品中,并且是青蟹发病的主要致病因子,疾病的爆发导致青蟹养殖业大量的经济损失。本实验模拟青蟹养殖环境,利用差异显示方法 cDNA-AFLP,分析青蟹受到病原微生物副溶血弧菌胁迫时的基因差异表达。

研究基因差异表达的方法很多,如 SSH、SAGE 和 DNA Microarray,这些技术虽然拥有高通量、高灵敏的优势,却存在样品需求量大、成本极高等问题。因此,本次研究选用了 cDNA-AFLP,用 10 对选择性扩增引物组合分析得到了 23 个差异条带,通过测序得到了 20 个差异条带的序列,且有 6 个片段鉴定为已知功能,8 个片段为未知功能。已有功能的 6 个差异表达片段经 real-time PCR 重新验证其中 5 个(V6,7,V11,V13,V15)为差异极显著(均为上调)。

V6 与张口蟹(*Chasmagnathus granulata*)磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)的 mRNA 有 78%相似。PEPCK 参与能量代谢途径,在糖酵解过程中,分解磷酸烯醇式丙酮酸,生成 2 分子丙酮酸,这是糖酵解过程中的第二次底物水平磷酸化,有两分子 ATP 生成。拟穴青蟹在弧菌感染的胁迫条件下提高 PEPCK 的表达可能需要获得更多的能量用于机体防御消耗^[10]。

V7 与马(*Equus caballus*)精氨酰-tRNA 合成酶的编码区有 76%相似,在翻译过程中,精氨酰-tRNA 合成酶将精氨酸连接到 tRNA 上,生成精氨酰-tRNA,参与蛋白质翻译。我们推测,弧菌胁迫后的青蟹提高了精氨酸类 t-RNA 合成酶的表达量,可能是用于合成更多的蛋白类免疫因子^[11]。这可能暗示

富含精氨酸类的免疫分子在青蟹的副溶血弧菌免疫应激中起重要作用。且 V11 片段序列分析为精氨酸激酶,精氨酸激酶在 ATP 存在时对精氨酸进行磷酸化,形成磷酸化精氨酸^[12]。V7 与 V11 的差异表达表明,精氨酸代谢在青蟹的副溶血弧菌应答反应中起重要的作用。

V15 与日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*) chymotrypsin-like proteinase 的编码区有 79%相似,据报道,该酶与消化、血液凝集、免疫反应等多种功能相关。有研究表明,在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)遭受病菌和病毒感染时该蛋白酶均上调表达^[13],在日本对虾中也观察到该基因在免疫增强剂聚糖刺激后在血液、淋巴及肝胰腺中诱导表达^[14]。糜状蛋白酶跟甲壳动物的能量代谢、凝集、免疫有关,受到副溶血弧菌胁迫后,青蟹提高凝乳状蛋白酶表达量,抵御外来病原菌的侵袭^[14]。据此推测,在青蟹的免疫应激中,糜状蛋白酶 chymotrypsin-like proteinase 起到了非常重要的作用,但具体作用机理还需进一步研究。

有关青蟹自身免疫因子的研究见诸报道。如 Imjongjirak 等^[15]克隆了抗脂多糖因子;Chen 等^[16]利用 SSH 分析了拟穴青蟹在脂多糖刺激下的基因表达,共 271 个基因片段差异表达,其中 14 个跟免疫相关;Wuang 等^[17]通过蛋白组学的方法从青蟹体内分离得到一种广谱性的具有较强抗菌能力的阴离子抗菌肽 Scygonadin;Liu 等^[18]通过分子手段从青蟹中克隆到一种具有杀菌效果的抗氧化酶;丁小丰等^[19]利用 DDRT-PCR(differential display reverse transcription PCR)初步研究患有黄水病的拟穴青蟹血液指标变化及基因的差异表达。总的来说,青蟹免疫应激的分子机理尚处于起步阶段,我们的结果丰富了青蟹病害的分子免疫应激机理研

究, 为进一步阐明其免疫应激过程并进行养殖中免疫防治奠定了基础。

此外, 实验得到的很多特异性表达片段, 通过 NCBI 的 BLAST 分析无法获知基因功能, 从而判定为未知基因, 这将有赖于青蟹基因组信息及功能基因组学的进一步阐释。总的来说, 实验成功地建立了适合用于拟穴青蟹差显表达分析的 cDNA-AFLP 指纹技术, 利用这一技术, 有效的获得了青蟹在病原菌胁迫下表达的部分免疫相关基因。差异基因的序列表明, 跟虾类似^[20], 青蟹在病原菌胁迫下的分子响应是一个复杂的多系统多因子参与的过程, 相关的免疫应激机理还需要更进一步的研究。

参考文献:

- [1] 夏小安, 吴清洋, 李远友, 等. 锯缘青蟹混合感染症致病菌的分离鉴定与感染治疗[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 1-8.
- [2] 吴清洋, 李远友, 夏小安, 等. 汕头牛田洋沿海围垦区锯缘青蟹病害爆发的环境因素[J]. 生态学报, 2010, 30(7): 1-6.
- [3] Bachem C W, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, *et al.* Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA finger-printing based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *Plant Journal*, 1996, 9(5): 745-753.
- [4] Cheng L, Liu L, Yu X, *et al.* A linkage map of common carp (*Cyprinus carpio*) based on AFLP and microsatellite markers [J]. *Animal Genetics*, 2009, 41(2): 191-198.
- [5] Zheng X, Chen X, Zhang X, *et al.* Isolation and identification of a gene in response to rice blast disease in rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54(1): 99-109.
- [6] Durrant W E, Rowland O, Piedras P, *et al.* cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles [J]. *Plant Cell*, 2000, 6(12): 963-977.
- [7] Xu J, Sankaran V G, Ni M, *et al.* Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6 [J]. *Genes & Development*, 2010, 24(8): 783-798.
- [8] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] Vuylsteke M, Peleman J D, van Eijk M J. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(6): 1399-1413.
- [10] Vanessa S, Ana L, Rodrigo E, *et al.* Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 316(2): 203-212.
- [11] Akaogi J, Barker T, Kuroda Y, *et al.* Role of non-protein amino acid L-canavanine in autoimmunity [J]. *Autoimmunity Reviews*, 2006, 5(6): 429-435.
- [12] Wu Q Y, Jin K Z, Li F, *et al.* Impact of intra-subunit interactions on the dimeric arginine kinase activity and structural stability [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 49(4): 822-831, 2011, 512(1): 61-8.
- [13] Shi X, Zhao X, Wang J. Molecular cloning and expression analysis of chymotrypsin-like serine protease from the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 589-597.
- [14] Danwattanasorn T, Kondo H, Aoki T, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of a chymotrypsin-like serine protease from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fisheries Science*, 2009, 75(5): 1231-1238.
- [15] Imjongjirak C, Amparyup P, Tassanakajon A, *et al.* Antilipopolysaccharide factor (ALF) of mud crab *Scylla paramamosain*: Molecular cloning, genomic organization and the antimicrobial activity of its synthetic LPS binding domain [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(12): 3195-3203.
- [16] Chen F Y, Liu H P, Bo J, *et al.* Identification of genes differentially expressed in hemocytes of *Scylla paramamosain* in response to lipopolysaccharide [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(1): 167-177.
- [17] Wang K J, Huang W S, Yang M, *et al.* A male-specific expression gene, encodes a novel anionic antimicrobial peptide, scygonadin, in *Scylla serrata* [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(8): 1961-1968.
- [18] 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 Immunology*, 2010, 28(5-6): 862-871.
- [19] 丁小丰, 杨玉娇, 金珊, 等. 温度变化对锯缘青蟹免疫因子的胁迫影响[J]. 水产科学, 2010, 29(1): 1-6.
- [20] Yao C L, Wu C G, Xiang J H, *et al.* Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 19(4): 317-329.

The differential gene expression of *Scylla paramamosain* upon *Vibrio parahaemolyticus* infection by cDNA-AFLP

LI Sheng-kang¹, ZHU Shuo^{1,2}, ZHANG Zhao^{1,2}, WEN Xiao-bo¹, LI Yuan-you^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biology, Shantou University, Shantou 515063, China;

2. Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: Mud crab *Scylla paramamosain* is widely cultured in brackish and seawater ponds along the coast of southeast China including Shantou. In recent years, mud crab cultured in Niutianyang reclaiming coastal area of Shantou suffered from serious diseases, especially the bacterial diseases (such as *Vibrio parahaemolyticus*), which results in high mortality and great economic loss. In present study, *V. parahaemolyticus* isolated from Shantou Niutianyang crab culture area was injected to *S. paramamosain* to study the differential gene expression of the mud crab by cDNA-AFLP technology. Furthermore, 20 fragments that exhibited differential expression were discovered and sequenced. The results show that 6 fragments are homologous to the known functional genes, 5 of which are up-regulated. They are involved in energy metabolism including arginine kinase, phosphoenolpyruvate-carboxykinase and glyceraldehydes 3 phosphate dehydrogenase, arginyl-tRNA synthetase involved in transport progress, as well as the chymotrypsin-like proteinase involved in defense response. The other 8 fragments were identified to be unknown function genes. The result here shows that the response of *S. paramamosain* upon *V. parahaemolyticus* infection is involved in multiple pathways and needs further investigation.

Key words: *Scylla paramamosain*; *Vibrio parahaemolyticus*; differential gene expression; cDNA-AFLP

Corresponding author: LI Yuan-you. E-mail: yyli@stu.edu.cn