

# Effect of *Aeromonas hydrophila* Treatment on the Expression of Complement Genes in Zebrafish

Zhiping Wang

Department of Life Science, Weinan Normal University, Weinan Shaanxi  
Email: wzhp1978@126.com

Received: Jun. 6<sup>th</sup>, 2019; accepted: Jun. 20<sup>th</sup>, 2019; published: Jun. 28<sup>th</sup>, 2019

---

## Abstract

The healthy zebrafish were maintained in well-aerated tap water at 25°C~27°C; 15 healthy zebrafish were selected and then immersed in 20 µg/ml *Aeromonas hydrophila* solution for 24 h; 3 fish were sampled at 3 h, 6 h, 12 h and 24 h; the expression levels of main complement genes were analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR. It was shown that the expression of C1r/s, C4, C6 and MASP all up-regulated after *A.h* treatment and reached the peak at 6 h which was followed by a decline. In contrast, down-regulation of C3, MBL and Bf expression was detected shortly after treatment, and then up-regulation followed and also peaked at 6 h or 12 h. These results indicated that complement system can effectively respond to infection in a short period of time, and different genes respond to the external stimulation in different ways, which might be caused by the different roles of complement components and complement pathways.

## Keywords

Zebrafish, Complement, *A.h* Treatment, Gene Expression, Real-Time Fluorescent Quantitative PCR

---

# 嗜水气单胞菌处理对斑马鱼补体基因表达水平的影响

王志平

渭南师范学院生命科学系, 陕西 渭南  
Email: wzhp1978@126.com

收稿日期: 2019年6月6日; 录用日期: 2019年6月20日; 发布日期: 2019年6月28日

## 摘要

将斑马鱼饲养在持续充气的自来水中,水温保持在25°C~27°C,取15条健康斑马鱼,用 $10^8$  cells/ml的嗜水气单胞菌溶液浸泡处理24 h, 3 h、6 h、12 h和24 h各取3条斑马鱼以实时定量PCR技术检测补体基因的表达水平。*A.h*处理后,斑马鱼体内C1、C4、C6和MASP的表达水平逐步升高,而C3、Bf和MBL的表达水平则先降低再升高,但它们都在处理6 h或12 h时达到峰值,之后其表达水平逐步降低。这表明鱼类补体系统能在短时间内对外界刺激做出应答,但是由于不同补体成分及补体激活途径在机体免疫中的作用差异,它们对外界感染做出的反应也有所不同。

## 关键词

斑马鱼, 补体, *A.h*处理, 表达水平, 荧光定量PCR

Copyright © 2019 by author(s) 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

补体系统大约包括 30 多种组分,常以无活性的酶原形式广泛存在于人和动物新鲜血清和组织液中。多种微生物、抗体-抗原复合物等物质可通过三条不同的途径激活补体,形成具有活性的产物,发挥趋化作用、调理作用、破坏目标微生物及免疫复合物的清除等生物学功能[1]。

近年来,我国水产养殖业发展迅速,随着高密度集约化养殖模式的大面积推广,使得鱼类细菌性疾病暴发较频繁,成为水产养殖面临的重要难题之一[2]。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, *A.h*)是一种很常见的致病菌,可引发细菌性败血症,能感染斑马鱼、银鲫、草鱼、青鱼及中华鳖等绝大多数淡水鱼类,也能感染虾、蟹等水产养殖种类,造成巨大经济损失[3]。

本实验以模式动物斑马鱼为研究对象,采用荧光定量 PCR 技术研究了 *A.h* 浸泡处理对斑马鱼体内补体基因表达水平的影响,旨在探讨不同补体系统在鱼类免疫应答中的作用,从而进一步完善关于鱼类免疫机制的认识。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 嗜水气单胞菌的培养

将 *A.h* 菌株接种于 TSB 固体培养基,28°C 培养 24 h 后挑取单菌落于 TSB 液体培养基中,振荡培养 15 h 后离心收集菌体并将其重悬于灭菌 PBS 中,梯度稀释后用血球计数板计数。取适量菌悬液加入 1 L 充分曝气的自来水中制成  $10^8$  cells/ml 的 *A.h* 溶液。

### 2.2. 斑马鱼的饲养与处理

将花鸟虫鱼市场购买的斑马鱼饲养于玻璃缸内。缸内连续充气,温度控制在 26°C~28°C 左右,每天喂食 2 次。驯养两周后取 15 尾健康斑马鱼放入  $10^8$  cells/ml [4]的 *A.h* 溶液中,0 h(对照)、3 h、6 h、12 h 和 24 h 各取 3 尾抽提总 RNA,检测补体。

### 2.3. 总 RNA 的提取及 cDNA 的制备

将斑马鱼用 DEPC 水洗三次, 除去多余水分后加入液氮迅速研磨, 再加入适量 TRIZOL 并提取总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 若检测结果良好, 则加入 DNaseI 消化后逆转录成 cDNA。用跨内含子的  $\beta$ -actin 引物对其进行 PCR 扩增(上下游引物为 5'-CTCCGGTATGTGCAAGGC-3' 和 5'-GCTGGGCTGTTGAAGGTC-3', 扩增片段 354 bp) [5]。扩增结束后对产物进行电泳检测, 若仅有特异性目的基因片段, 说明无基因组污染, 该 cDNA 可用于定量 PCR 分析; 反之, 需对总 RNA 重新消化并反转录。

### 2.4. Real-Time PCR 分析

7 个代表性补体基因的引物序列来自 Wang 等[6], 以  $\beta$ -actin 基因作为参考基因[7]。各基因引物序列和扩增子长度见表 1。

以普通 PCR 确定 cDNA 和引物质量后, 按照 SYBR GREEN Real-time PCR Master Mix 说明书用定量 PCR 仪进行扩增。每个样品设 3 个平行, 运行程序见表 2。

**Table 1.** Primers used in quantitative PCR analysis

**表 1.** 定量 PCR 分析中所用引物

基因	上下游引物(5'-3')	扩增子长度(bp)
Actin	CGAGCAGGAGATGGGAACC CAACGAAACGCTCATTGC	102
C3	GTATTACTCACCCGATGCCCG AGATGGGGTTCACAGGCTTTAAT	146
Bf	GCTGTCCACGGAAAATAAGG TCGGTCGCATCTGCCACT	108
C1r/s	GAGTTGTGTTTCAGATGGCTTGC CATTGCGATGGTCTCAGTTCC	177
C4	TCTGTTGGAGGAGGAGGATTC AGGTGCTCTCCTGACACGATTG	142
MBL	GCAGAGCCAGGAGTGAATGTG ACCTTCTCAATCAGGGCAATC	173
MASP	CTGTGGTTCGCTGGTTCGG TGTTGGCGGACATCTGTAAGG	157
C6	ATGACGCTGGCAAGGAAACT TGTCTGAACCGCAGGGCTC	189

**Table 2.** Quantitative PCR running procedure

**表 2.** 定量 PCR 运行程序

94°C	10 s	1个循环
94°C	5 s	
60°C	15 s	40个循环*
72°C	35 s	
熔解曲线分析		

\*在每个循环的延伸阶段收集荧光信号。

## 2.5. 数据分析

定量 PCR 扩增结束后, 根据参照基因和目的基因的 Ct 值, 用相对 Ct 法( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )计算各基因的相对表达量[8]。最终结果用对照组 C3 表达量作参照。

## 3. 实验结果

### 3.1. *A.h* 处理对斑马鱼 C3 表达水平的影响

C3 是补体系统的关键成分, 同时参与三条补体激活途径。*A.h* 处理斑马鱼后 C3 的表达量变化见图 1。处理 6 h 以内 C3 表达水平无显著变化, 之后其表达水平迅速升高, 在 12 h 达到峰值(2.807), 之后 C3 表达水平快速降低, 但 24 h 时其表达量(1.682)仍高于对照组。

### 3.2. *A.h* 处理对斑马鱼 Bf 表达水平的影响

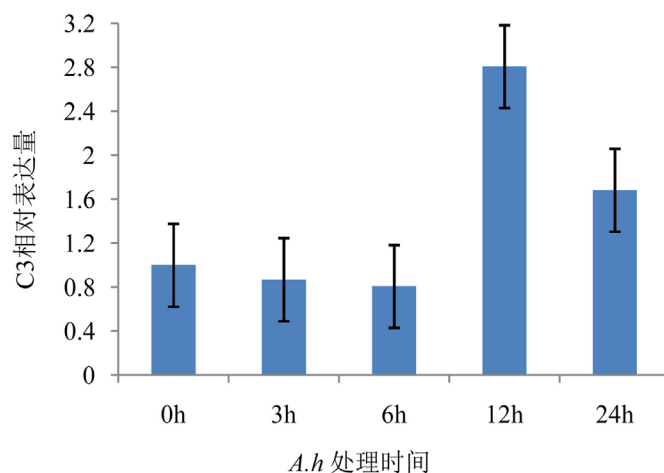
Bf 是补体替代激活途径中的重要成分。由图 2 可以看出, *A.h* 处理 3 h 时 Bf 的表达水平无显著变化, 6 h 时迅速升高并达到峰值(2.313), 随后其表达水平快速降低, 24 h 时降至与对照组相当的水平。

### 3.3. *A.h* 处理对斑马鱼 C1r/s 和 C4 表达水平的影响

C1r/s 和 C4 都是经典激活途径中的重要补体成分。其中 C1 是经典激活途径中的起始成分, 包括 C1r 和 C1s 两个组分; C4 是经典激活途径中第 2 个被活化的补体成分。对照组 C1r/s 和 C4 的表达水平(图 3)显著低于 C3 和 Bf。*A.h* 处理后, C1r/s 表达水平变化趋势与 Bf 十分相似, 都从 6 h 开始升高并达到最高值(0.188), 但 *A.h* 处理 12 h 后 C4 表达水平才开始上升并达到最高值(0.113)。之后, 二者表达水平逐步降低, 24 h 时其表达水平仍高于对照组。

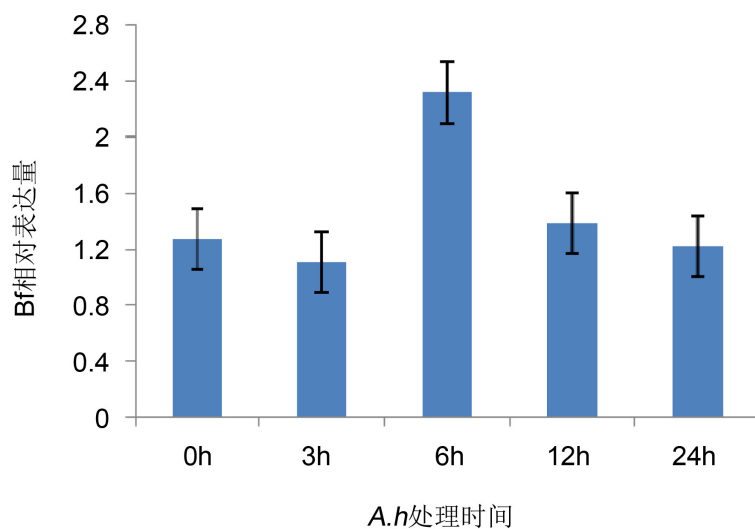
### 3.4. *A.h* 处理对斑马鱼 MBL 和 MASP 表达水平的影响

MBL 和 MASP 是凝集素途径的重要成分。从图 4 可以看出, MBL 和 MASP 的含量相差较大, 但二者表达水平(分别为 0.351 和 0.006)均显著低于 C3 和 Bf。*A.h* 处理斑马鱼 6 h 后 MBL 表达水平开始升高并在 12 h 升至最高值(0.611), 之后表达水平快速降低, 在 24 h 时略低于对照组。与 MBL 类似, MASP 也从 *A.h* 处理 6 h 后开始上调表达并迅速达到峰值(0.013), 之后其表达水平逐渐下降, 但 24 h 时其表达

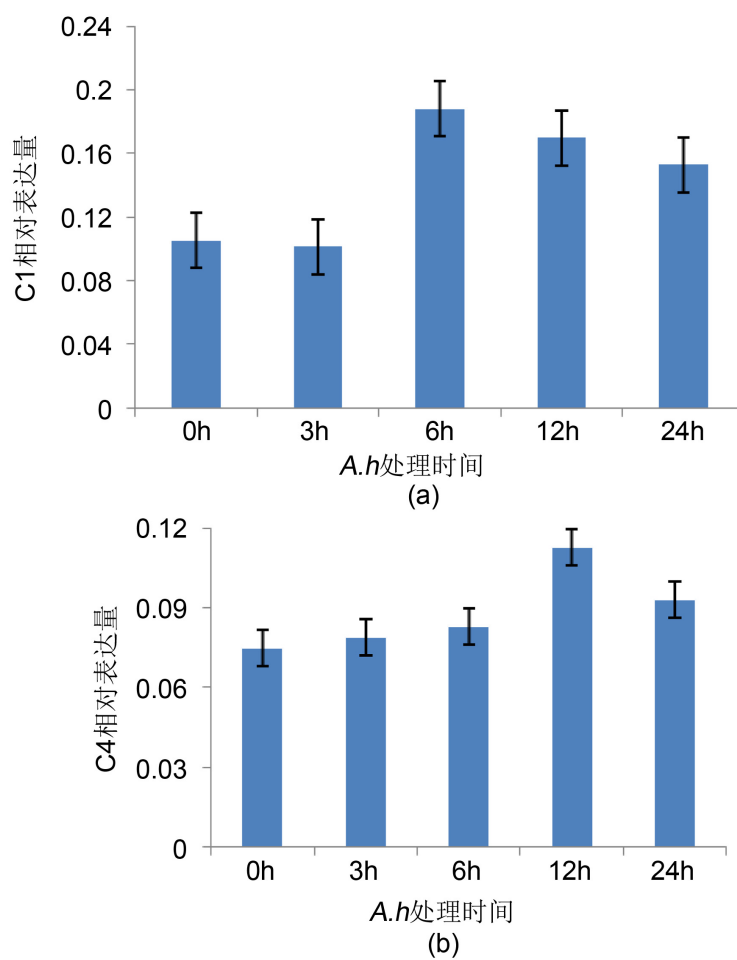


**Figure 1.** Changes on the expression of C3 in zebrafish during *A.h* infection

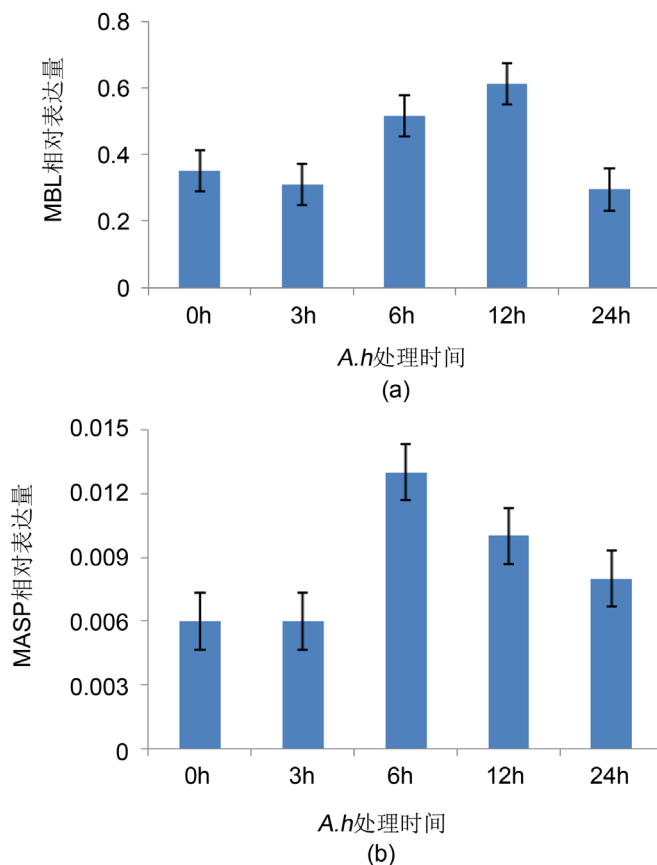
**图 1.** *A.h* 处理对 C3 表达水平的影响



**Figure 2.** Changes on the expression of Bf in zebrafish during *A.h* infection  
**图 2.** *A.h* 处理对 Bf 表达水平的影响



**Figure 3.** Changes on the expression of C1r/s (a) and C4 (b) in zebrafish during *A.h* infection  
**图 3.** *A.h* 处理对 C1r/s (a)和 C4 (b)表达水平的影响



**Figure 4.** Changes on the expression of MBL (a) and MASP (b) in zebrafish during *A.h* infection

**图 4.** *A.h* 处理对 MBL (a)和 MASP (b)表达水平的影响

水平仍略高于对照组。

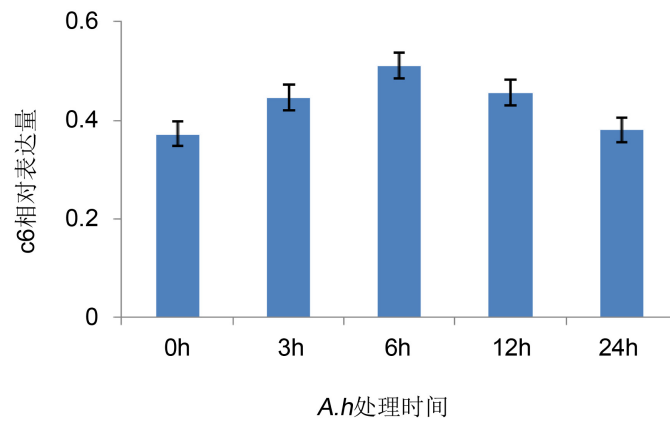
### 3.5. *A.h* 处理对斑马鱼 C6 表达水平的影响

C6 在终末途径中有重要作用。由图 5 知, 对照组 C6 表达水平(0.373)与 MBL 相当, *A.h* 处 3 h 后 C6 表达水平开始缓慢升高并在 6 h 达最高值(0.512), 此后逐步降低, 24 h 时表达水平与对照组持平。

## 4. 讨论

本试验发现, 以 *A.h* 处理斑马鱼成体后, C3、MBL 和 Bf 的表达水平都是先降低后升高, 之后再降低。其中, C3 和 MBL 在 12 h 达到最高值, Bf 在 6 h 达到最高值。相比之下, C1、C4、C6 和 MASP 从处理 3 h 后便开始逐步升高, 其中 C1、C6 和 MASP 在处理 6 h 后达到峰值, 而 C4 在处理 12 h 后达到峰值。另外, 除 C3 和 MBL 在处理 24 h 时其表达水平降至低于对照组的水平, 其他基因在处理 24 h 后的表达水平仍高于对照组。由此可知, 补体系统可在短时间内对外界的感染做出有效应答, 但是不同基因应答模式不同, 可能与不同补体成分及补体激活途径在机体免疫中的作用差异有关。

鱼类养殖中容易暴发大规模的传染性疾病而死亡, 给水产养殖行业带来巨大的经济损失。另外, 一旦鱼病暴发, 后期的治疗通常起效甚微。因此, 水产养殖中, 对于鱼病的防控要重于鱼病的治疗。提高鱼类免疫力是进行病害免疫防治的有效措施之一。因此, 水产养殖中应积极探索提高鱼类免疫力的有效措施。



**Figure 5.** Changes on the expression of C6 in zebrafish during *A.h* infection

**图 5.** *A.h* 处理对 C6 表达水平的影响

## 基金项目

陕西省自然科学基金面上项目(2017JM3017)。

## 参考文献

- [1] 王志平, 张士瑾, 王光峰. 鱼类补体系统成分及补体特异性和功能的研究进展[J]. 水生生物学报, 2008, 32(5): 761-765.
- [2] 林福森. 养殖鱼类常见细菌性疾病的防治[J]. 江西水产科技, 2016(4): 41-45.
- [3] 唐英, 夏虎, 陆风辉, 等. 鱼类感染嗜水气单胞菌后的病理特征及其防控措施[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2017, 29(3): 33-38.
- [4] 宋春雨. 苦地胆内酯对嗜水气单胞菌感染斑马鱼的保护效果及其机理初探[D]: [硕士学位论文]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.
- [5] 王志平, 韩彦军, 刘小宁, 等. 细菌脂多糖处理对斑马鱼补体基因表达水平的影响[J]. 水产科学, 2014, 33(2): 115-118.
- [6] Wang, Z.P., Zhang, S.C. and Wang, G.F. (2008) Response of Complement Expression to Challenge with Lipopolysaccharide in Embryos/larvae of Zebrafish (*Danio rerio*): Maturation of Complement Immunocompetence. *Fish and Shellfish Immunology*, **25**, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.05.010>
- [7] Tang, R., Dodd, A.W., Lai, D., et al. (2007) Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-Time RT-PCR Normalization. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, **39**, 384-390. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00283.x>
- [8] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*, **25**, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2373-1443，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[ojfr@hanspub.org](mailto:ojfr@hanspub.org)